

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

COLLOQUE ANNUEL
DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

1^{re} Journée : 11 Juin 1959

Problèmes généraux d'Immunologie

RÉACTIONS PROTÉINE-ANTIPROTÉINE

par Pierre GRABAR.

(Service de Chimie microbienne, Institut Pasteur, Paris)

Un très grand nombre de renseignements précis et utiles a été obtenu par l'utilisation des réactions antigène (Ag)-anticorps (Ac) dans diverses études sur des protéines. Les rapports présentes à ce Colloque illustrent d'une manière détaillée quelques-unes des applications récentes de telles études.

Dans cet exposé, nous n'envisagerons que deux des aspects généraux de la réaction protéine-antiprotéine : l'intervention des structures de ces molécules et les conséquences de leur union.

Landsteiner a démontré que la spécificité des réactions Ag-Ac est due à la configuration spatiale de groupements chimiques et à une adaptation complémentaire des structures des Ac à celle des Ag. De nombreuses recherches ont été effectuées pour essayer de préciser les groupements en cause dans les antigènes naturels, leurs dimensions et les forces qui interviennent dans la formation

des complexes Ag-Ac. Actuellement, en plus du terme classique de « groupement déterminant » de la spécificité antigénique, on utilise le terme anglais « antigenic site » (site ou emplacement antigénique) pour désigner la partie de la molécule qui intervient dans une réaction spécifique. Nous employons aussi l'expression de « motif antigénique » d'une molécule lorsque nous parlons de l'ensemble de ses groupements spécifiques qui peuvent ne pas être situés au même endroit de la molécule.

Les travaux sur les Ag artificiels ont montré que l'on peut obtenir des Ac spécifiques pour pratiquement n'importe quelle configuration chimique. Tous les « restes » d'acides aminés qui émergent des chaînes peptidiques ainsi que les groupements peptidiques eux-mêmes peuvent donc être des « groupements déterminants ». Dans ces conditions, on pourrait s'étonner qu'il existe des protéines dépourvues d'antigénicité ou seulement faiblement antigéniques. Pour tenter de se l'expliquer, on peut imaginer soit que ces protéines sont très facilement ou complètement dégradées dans l'organisme qu'on essaye d'immuniser, soit qu'elles possèdent une structure qui diffère de celle des protéines que l'on classe comme nettement antigéniques et qui sont du type globulaire.

Si nous prenons comme exemple la gélatine qui possède une structure plus ou moins filiforme, on sait qu'elle n'est que très faiblement antigénique (Maurer), mais qu'elle le devient plus lorsqu'on la couple avec certaines substances, même possédant des petites masses moléculaires.

Un autre exemple de molécules formées par une seule chaîne peptidique et plus ou moins filiformes serait celui des polypeptides synthétiques. Dans un travail fait en collaboration avec Stahmann et Lapresle, nous avons constaté que certaines préparations sont antigéniques, bien que très faiblement, tandis que les autres n'ont pas provoqué la formation d'Ac spécifiques. Les raisons de la légère antigénicité de certaines préparations nous échappent, car les méthodes de synthèse des divers polypeptides ont été les mêmes, mais certaines d'entre elles possédaient une structure particulière. Dans le même travail, nous avons constaté que des Ac anti-polypeptides, particulièrement les anti-polylysines et anti-acide polyglutamique, donnaient des réactions de précipitation avec quelques protéines naturelles. Ce fait semble démontrer que des groupements analogues à ceux des polypeptides, et susceptibles de réagir avec les Ac correspondants, existent sur les molécules de ces protéines. Il ne doit cependant pas s'agir par exemple d'un groupement unique carboxyle de l'acide glutamique ou d'un seul groupement aminé de la lysine ; en effet, puisque toutes les protéines en contiennent, on devrait alors observer des réactions avec pratiquement toutes. Il s'agirait plutôt

d'un groupement comportant au moins deux acides glutamiques ou deux lysines associées. Des groupements comportant deux acides aminés identiques associés existent dans les protéines ; ils ont été trouvés parmi des produits de leur dégradation. On admet depuis longtemps que les sites ou emplacements antigéniques des protéines correspondent à plus d'un reste d'acide aminé. D'après des considérations sur les forces des liaisons entre Ag et Ac, Hooker et Boyd avaient suggéré que les sites antigéniques devraient représenter un ensemble comportant au moins une dizaine de restes d'acides aminés. Plus récemment, Singer est arrivé à admettre que ces emplacements antigéniques doivent comporter plus d'un et moins de dix acides aminés. Ce nombre est relativement petit par rapport à la masse totale d'une molécule protéique ; il ne correspond donc qu'à une portion restreinte de la molécule. Mais, puisque nous savons que le motif antigénique d'une protéine comporte plusieurs groupements déterminants différents, il n'est pas impossible qu'une partie assez importante de la molécule puisse finalement jouer un certain rôle dans ses propriétés spécifiques.

Beaucoup de travaux ont été entrepris dans l'espoir de préciser les groupements en cause à l'aide de méthodes de blocage ou de destruction de certaines fonctions chimiques des Ag ou des Ac. Malheureusement, dans de nombreuses études de ce genre, les méthodes utilisées peuvent être critiquées, soit parce qu'elles ne permettent pas de préciser la nature des groupements attaqués, soit parce qu'elles peuvent provoquer une modification de structure par dénaturation des protéines. D'autre part, un groupement déterminant légèrement modifié peut garder une structure suffisamment analogue pour donner lieu à une réaction croisée. Enfin, une destruction d'un des groupements déterminants d'un Ag ne provoque pas nécessairement la suppression de la réaction de cet antigène avec les Ac, car cette molécule en possède certainement plusieurs. Dans ces derniers cas, l'aspect quantitatif de la réaction devrait cependant être modifié.

Nous nous limitons à mentionner seulement quelques travaux récents sur les groupements NH₂ libres (groupements terminaux des chaînes peptidiques et ϵ de la lysine). L'utilisation d'une méthode d'acétylation qui, d'après Fraenkel-Conrat, ne bloque que ces groupements et ne provoquerait pas de dénaturation, a permis à Singer d'affirmer que ces groupements n'interviennent pas dans la spécificité antigénique de la sérumalbumine et la γ -globuline bovines, de l'ovalbumine, de la β -lactoglobuline, de la conalbumine et des antigènes protéiques couplés par diazotation à des haptènes. Le blocage du NH₂ de la sérumalbumine bovine par l'O-méthyl-isourée (Hughes) ne modifierait pas non plus sa spécificité. Les groupements sulfurés semblent aussi sans

importance (Heidelberger et coll.), ainsi que les groupements phosphorylés de l'ovalbumine, puisque les trois sous-fractions de mobilités différentes sont antigéniquement identiques (Kaminski). D'après Singer, ce seraient des carboxyles qui joueraient un rôle dans les propriétés antigéniques des protéines.

En ce qui concerne les Ac, les résultats obtenus par acétylation ménagée ont montré que les groupements NH_2 sont très importants, car leur blocage supprime leur activité précipitante (Sci Ram et Maurer ; Singer). D'après Marrack et Orlans, cette inactivation serait non spécifique, tandis que Singer la considère comme spécifique, car la même méthode appliquée à des Ac de lapin les inactive, tandis qu'elle ne modifie pas les propriétés antigéniques d'une γ -globuline bovine, par exemple. Il admet qu'un groupe NH_2 est présent dans les groupements spécifiques des anticorps précipitants.

L'intervention probable des groupements polaires des molécules d'Ag ou d'Ac a été envisagée depuis longtemps, puisqu'on savait que leur réaction est modifiée par des variations du pH et que l'on arrive à dissocier certains complexes protéine-anti-protéine, par exemple en milieu acide. De l'ensemble de ses récentes études, Singer conclut qu'il y aurait un groupement carboxyle dans chaque « site antigénique » d'une molécule d'antigène et un seul groupement aminé présent dans chaque groupement spécifique de la molécule d'anticorps. Il ne faut cependant pas perdre de vue que cette conception n'exclue pas à priori d'autres possibilités et, de plus, que le site antigénique n'est certainement pas limité à un seul groupement fonctionnel.

Il serait trop long d'entrer ici dans les détails des comparaisons que l'on pourrait faire entre le cas des Ag protéiques et d'Ag ou d'haptènes de nature chimique différente. Notons seulement que certains polyosides ne renferment ni carboxyle, ni groupements aminés et que dans de nombreux cas des complexes polyoside-anti-polyosides sont partiellement dissociés simplement par une forte concentration saline. De plus, lorsqu'on envisage les réactions du type croisée données par des produits d'origine naturelle éloignée, on constate qu'il s'agit de substances de nature non protéique, tandis que les protéines donnant des réactions croisées sont d'origine semblable. Les cas des polyosides d'origines différentes donnant des réactions croisées sont bien connus. Récemment, Seligmann a pu constater un fait analogue en étudiant la réaction de précipitation que donnent des sérum de cas de lupus érythémateux disséminé avec des acides désoxyribonucléiques d'origines variées (leucocytes ; thymus de veau, microbes, bactériophages). L'explication de ces faits est aisée : en effet, le nombre de constituants simples formant les macromolécules des polyosides ou des acides nucléiques et les possibilités qu'ils possèdent

de former des configurations spatiales différentes sont beaucoup plus restreintes que ceux du nombre d'acides aminés et d'associations qu'ils peuvent former dans une molécule protéique.

Dans ces dernières, en dehors du fait bien établi que les acides aminés y sont associés par un enchaînement peptidique, on admet que les chaînes ainsi formées sont disposées en hélices. Les « restes » des acides aminés, n'entrant pas dans la constitution de la chaîne peptidique, émergent soit vers l'extérieur soit vers l'intérieur de l'hélice. Ces restes peuvent servir pour former des ponts soit à l'intérieur de la même chaîne, soit entre deux chaînes voisines. Le site antigénique pourrait correspondre non pas seulement à un enchaînement de quelques acides aminés le long d'une seule chaîne peptidique, mais à une configuration dont feraient partie des acides aminés situés sur deux (ou plusieurs) chaînes peptidiques voisines. En effet, les renseignements que l'on possède, par exemple sur la structure du collagène, montrent que les positions relatives des acides aminés dans deux chaînes voisines sont bien déterminées et limitées par leurs dimensions spatiales, elles sont donc caractéristiques et constantes, ce qui correspondrait à la notion de spécificité.

On sait que la nature du sucre terminal joue un rôle important dans les réactions spécifiques des polyosides, mais qu'il n'est pas le seul à y participer. Dans le cas des Ag protéiques, le rôle des groupements terminaux des chaînes peptidiques n'est pas élucidé. Le fait qu'une molécule protéique peut posséder plusieurs emplacements antigéniques situés dans des parties distinctes de la molécule prouverait qu'il y a des groupements spécifiques en dehors de la partie terminale des chaînes dans le cas des molécules formées par une seule chaîne (comme la sérumalbumine ; Lapresle et coll.) ou de celles qui ne possèdent pas de groupements terminaux décelables par les méthodes actuelles (comme l'ovalbumine ; Kaminski et coll.). On peut donc penser que dans les protéines, les groupements déterminants ne sont pas nécessairement situés à un des bouts de la chaîne peptidique.

L'étude aux rayons X de quelques protéines globulaires indique qu'en plus de l'enroulement en hélice des chaînes peptidiques, l'ensemble de ces chaînes présente de nombreux replis. Des modèles de telles molécules plus ou moins conformes à la réalité ont été construits. Lorsqu'on essaye de se représenter comment deux molécules de ce genre, en l'occurrence un Ag protéique et son Ac, peuvent s'unir, on est amené à conclure, d'abord que les groupements qui s'unissent ne pourraient correspondre qu'à une partie très petite de la surface de ces molécules, et tout particulièrement si ils sont situés le long d'une seule chaîne peptidique. En effet, ces chaînes étant enroulées sous forme hélicoïdale, on ne voit pas comment deux molécules pourraient se rapprocher

suffisamment pour s'unir par plusieurs groupements situés le long d'une seule chaîne peptidique, à moins d'envisager une distorsion de cette chaîne. De même, lorsqu'on suppose que le groupement actif correspond à plusieurs acides aminés situés sur des chaînes voisines, on est obligé d'admettre qu'il existe des surfaces suffisamment plates pour permettre l'accrolement des deux molécules et correspondant à plusieurs restes d'acides aminés, ou bien qu'il existe des endroits où une boucle d'une des deux molécules correspond à un repliement de l'autre. Les cristallographes trouvent que la structure en hélice s'oppose à l'existence de boucles, mais ils admettent qu'une partie de la chaîne peptidique ne possède pas de structure en hélice.

L'existence de chaînes latérales qui émergeraient latéralement des principales chaînes peptidiques n'a pas été démontrée d'une manière indiscutable en ce qui concerne les protéines naturelles. Dans le cas des haptènes polyosidiques, on attribue un rôle important à l'existence de branchements pour expliquer la spécificité de leur réaction. De même, dans les antigènes artificiels, formés par la fixation de petites molécules sur des protéines, les groupements déterminants doivent émerger de la structure fondamentale de la protéine. Dans ces cas, le groupement spécifique de l'Ac serait situé dans une boucle de sa structure et sa spécificité plus ou moins étroite serait due aux dimensions de cette boucle.

Cependant, la distorsion de la structure des Ac (ou de Ag) comme suite à la formation des complexes Ag-Ac n'est pas exclue. Depuis longtemps d'ailleurs, on parle de la dénaturation des Ac par leur union avec des Ag, et il existe des faits qui plaideraient en faveur de cette idée. On sait, par exemple, qu'il est d'autant plus difficile de dissoudre un précipité spécifique par un excès d'Ag que ce précipité est plus vieux, ce qui indiquerait qu'il se produirait une transformation lente au cours de ce vieillissement. Dans des expériences préliminaires (que nous espérons pouvoir élargir à d'autres systèmes précipitants), nous avons observé avec M^{me} B. Robert, que lors de leur réaction avec des Ag (sérum-albumine humaine, polyosides bactériens) les Ac de cheval libèrent des groupements -- SH dont on ne constate pas la présence à l'état libre dans les molécules des globulines γ du cheval. Enfin, Milgrom a montré la formation d'Ac spécifiques anti-hémagglutinines modifiées par leur union avec les constituants des érythrocytes.

Des nombreuses études effectuées avec des protéines dénaturées, on peut conclure que la dénaturation altère la configuration spécifique d'une protéine et fait apparaître une spécificité nouvelle, celle de la protéine ainsi modifiée. Il semble exister des différences entre ces nouvelles spécificités suivant l'agent dénaturant utilisé, ce qui n'est pas étonnant puisque les modifications pro-

voquées ne sont pas nécessairement les mêmes (Heidelberger et coll. ; Kaminski et Grábar). Lorsqu'on parle de dénaturation des protéines, on dit souvent qu'elle provoque un déroulement ou un dépliement de la chaîne peptidique. Or, le fait que les protéines dénaturées possèdent une spécificité antigénique particulière prouve que leur structure est bien définie ou rigide et qu'il ne s'agit pas simplement d'une chaîne peptidique dépliée susceptible de se plier à nouveau n'importe comment. La perte de la spécificité originelle, par une protéine dénaturée, peut s'expliquer de plusieurs manières, par exemple par des modifications chimiques (par exemple des oxydations), elle peut résulter aussi du fait d'un dépliement de la chaîne peptidique, les distances entre les « restes » des divers acides aminés étant modifiées, ou bien si l'emplacement antigénique s'étend sur deux chaînes peptidiques voisines, la dénaturation pouvant provoquer un déplacement de l'une par rapport à l'autre, le groupement spécifique se trouverait disloqué. Les données que l'on possède actuellement sont insuffisantes pour choisir entre ces possibilités.

Des renseignements plus précis sur les groupements spécifiques des Ag et des Ac doivent pouvoir être obtenus à l'aide de méthodes de dégradation ménagée, par exemple à l'aide de protéases. Les résultats de telles études sur des Ag protéiques seront exposés dans un autre rapport. Disons seulement que ces études ont apporté une preuve directe de l'existence dans le motif antigénique d'une protéine de plusieurs sites ou emplacements antigéniques distincts et situés dans des parties différentes de la molécule d'Ag. D'autre part, elles ont permis de préciser l'hétérogénéité des Ac, même lorsqu'ils sont spécifiques d'une seule molécule antigénique. La protéolyse a été également utilisée dans des études sur des Ac et la dégradation peptique des sérum de chevaux hyperimmunisés (Parfentiev ; Pope) est actuellement utilisée d'une façon industrielle pour l'obtention d'antitoxines purifiées. La molécule d'antitoxine est partiellement dégradée, mais conserve ses propriétés d'anticorps (Pappenheimer et coll.). Le même procédé appliqué à des Ac anti-polyosidiques du cheval leur fait perdre leurs propriétés spécifiques (Grabar ; Pappenheimer et coll.) ; cette perte est due, au moins en partie, à l'action de l'acidité sur ces molécules très volumineuses (Weill et coll.). Récemment, Porter a réussi à cliver avec de la papaïne, des Ac de lapin et à isoler trois produits de dégradation dont deux possèdent des propriétés spécifiques d'anticorps ; elles ne provoquent plus de précipitation spécifique, mais inhibent cette précipitation par le sérum complet. Pour le moment, on ne sait pas encore si ces deux fractions correspondent à des parties différentes de la molécule.

On admet généralement que les forces qui unissent les Ag aux Ac sont de nature différente : covalence, forces de van der Waals, liaisons hydrogène. Mais il est évident que lorsqu'on connaîtra les groupements chimiques en cause, il sera plus facile de préciser leurs importances relatives. Des études thermodynamiques (Wurmser et coll., Steiner et Kitsinger, Singer) ont permis de calculer les constantes de certaines réactions ; l'énergie d'une réaction protéine-antiprotéine est de 5 à 7 K cal/mol., ce qui n'est pas beaucoup et ne permet pas de préciser la nature des forces en cause. On est réduit à des preuves indirectes. Ainsi, puisque les groupements déterminants peuvent être de constitution chimique fort différente (par exemple polaires ou non), puisque d'autre part, suivant la nature chimique de l'Ag, il faut utiliser des procédés différents pour dissocier des complexes Ag-Ac, on peut inférer que les forces en cause doivent être différentes. On aurait pu supposer que dans les cas où l'Ag ou le haptène spécifique comportent surtout des groupements déterminants acides ou, au contraire basiques, les Ac correspondants devraient avoir des propriétés électrochimiques nettement distinctes. Or, dans nos expériences avec Stahmann et Lapresle sur les polypeptides synthétiques, les Ac anti-polylysine et anti-acide poly-glutamique avaient des mobilités électrophorétiques voisines sinon identiques.

Mais de toute façon, même si les groupements polaires jouent un certain rôle, de nombreux faits prouvent que d'autres groupements font partie des motifs antigéniques. Il s'ensuit que des forces du type liaison hydrogène peuvent parfaire l'union, surtout parce qu'elles sont nombreuses et qu'elles correspondent à une adaptation spatiale entre l'Ag et l'Ac. Singer leur attribue moins de la moitié de l'énergie de liaison.

En ce qui concerne les conséquences de l'union Ag-Ac, elles sont suffisamment connues pour ne pas y insister longuement. Les molécules protéiques, qu'elles soient Ag ou Ac, sont maintenues en solution dans l'eau par le fait qu'elles renferment des groupements dissociables. En s'unissant, deux molécules de protéines forment un complexe dont la solubilité dépendra du rapport entre le nombre de groupements qui assurent sa liaison avec l'eau et la masse totale du complexe. Il s'ensuit que la solubilité des complexes Ag-Ac doit dépendre de la solubilité propre de chacun des constituants, des proportions de ces constituants dans le complexe et du nombre de groupements susceptibles de le maintenir en solution qui restent libres après la formation du complexe. Ce raisonnement permet d'expliquer en partie l'existence de zones de précipitation plus ou moins étendues suivant la solubilité de l'Ag ou la provenance de l'immunsérum utilisé. Les résultats obtenus par Williams dans ses essais de précipitation de diverses préparations de globulines γ par un immunsérum semblaient

confirmer cette manière de voir ; malheureusement, il a pu constater ultérieurement que ces préparations contenaient une légère impureté (macroglobuline β_2) qui pouvait fausser ses résultats.

La formation de précipités insolubles s'expliquerait par un blocage des groupements responsables de la solubilité, par suite de l'union Ag-Ac, ce qui confirmerait leur intervention dans cette réaction. Inversement, si le motif antigénique ne comporte pas de groupements intervenant dans la solubilité, on devrait aboutir à des complexes solubles. Il est cependant difficile de l'affirmer, car le seul accroissement de la masse du complexe suffit peut-être pour en provoquer la précipitation.

De plus, il ne faut pas oublier que les précipités spécifiques contiennent des lipides qui favorisent la précipitation et dont l'importance a été confirmée récemment par Tayeau et coll. Les constituants du complément, même dans un sérum inactivé par la chaleur, se fixent aussi sur un précipité spécifique. Le complément augmente donc la quantité de précipité, mais il n'est pas nécessaire pour la précipitation, car elle a lieu même avec des sérum qui en ont été débarrassé par une absorption préalable.

Un nombre considérable de publications a été consacré à des questions telles que : la valence des Ag et des Ac, le mécanisme de la formation des complexes Ag-Ac, etc. D'une manière assez générale, on avait admis que les Ag sont polyvalents, tandis que les Ac sont, mais pas toujours, bivalents et que, de ce fait, leur union spécifique aboutit à des complexes de plus en plus volumineux par formation de réseaux (Heidelberger, Marrack). Plusieurs auteurs et notamment Goldberg ont établi des expressions mathématiques qui correspondent assez bien aux résultats expérimentaux. Cependant, pour pouvoir établir ces équations, on est obligé de faire quelques postulats permettant de simplifier le problème. C'est ainsi que dans toutes les discussions, aussi bien sur les valences que sur le mode de formation des complexes, ainsi que dans les formules mathématiques, on a été obligé de négliger un fait qui nous paraît important : l'hétérogénéité des Ac présents dans un immunisérum. Or, nous savons qu'un même sérum peut contenir en proportions variables des Ac spécifiques du même Ag qui diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques, et tout particulièrement par leurs mobilités électrophorétiques, et par leur comportement en présence de l'Ag : précipitants, co-précipitants, et non précipitants ; enfin, ils diffèrent par leur spécificité puisqu'ils réagissent avec des groupements spécifiques distincts situés dans des parties différentes de la molécule d'Ag. Ces diverses hétérogénéités des Ac sont susceptibles d'intervenir d'une façon importante dans certains aspects du problème de la réaction Ag-Ac.

Mais quelles que soient les structures intimes des Ag et des Ac

et les forces responsables de leur union, l'utilisation de la réaction Ag-Ac a permis l'obtention de renseignements fort importants dans de nombreuses études sur des sujets variés. Dans cet exposé, nécessairement limité, nous n'envisagerons parmi les diverses méthodes de mise en évidence d'une réaction protéine-antiprotéine que la réaction de précipitation spécifique, bien que d'autres procédés peuvent rendre et ont rendu de grands services, surtout par leur plus grande sensibilité.

Cette réaction est utilisée aussi bien pour des dosages quantitatifs que dans des analyses qualitatives. Au cours des deux dernières décades, grâce aux travaux de Heidelberger et de ses collaborateurs, l'emploi quantitatif de la réaction de précipitation et l'établissement de courbes de précipitation spécifique sont devenus d'un usage courant en immunochimie. On peut ainsi non seulement apprécier pondéralement la quantité d'Ac dans un sérum ou d'Ag dans une solution inconnue, mais aussi différencier des réactions croisées et obtenir parfois des renseignements sur l'homogénéité d'une préparation antigénique (forme de la courbe ; étude des liquides surnageants). Son emploi est surtout indiqué lorsqu'on étudie un système de précipitation limité à un seul Ag pur ou lorsque l'immunsérum ne renferme pas d'Ac envers d'éventuelles impuretés de la solution de l'Ag. Mais en réalité, même dans ce cas, le système n'est pas simple. Bien que l'on admettait l'hétérogénéité de spécificité des Ac, en se basant sur le fait que dans les réactions croisées, une partie des Ac ne précipite pas, on n'en a pas assez tenu compte dans l'établissement des théories. Or, maintenant qu'il a été prouvé qu'un immunsérum renferme des Ac différents qui réagissent avec des groupements distincts, situés dans des parties différentes de l'Ag, il faut admettre que les courbes de précipitation spécifique sont, en réalité, des résultantes de plusieurs réactions, qui ne sont cependant pas entièrement indépendantes puisqu'il est probable qu'une molécule d'Ag peut fixer simultanément des Ac spécifiques de groupements différents. Dans un sérum, les proportions relatives d'Ac envers des groupements différents ne sont vraisemblablement pas identiques. De ce fait, pour une certaine quantité d'Ag ajouté à un immunsérum, on peut épuiser tous les Ac spécifiques d'un groupement de l'Ag, mais pas tous ceux qui réagissent avec les autres. Il est probable que l'élargissement des courbes de précipitation que l'on observe pendant l'hyperimmunisation de lapins s'explique surtout par l'enrichissement du sérum en Ac spécifiques de groupements différents de l'Ag.

La situation est encore plus compliquée lorsqu'on compare des immunsérum de plusieurs animaux, même immunisés de façon identique, car les proportions relatives d'Ac envers des groupements déterminants distincts de l'Ag y sont différentes. Les

recherches de Scheidegger et de Burtin ont permis de montrer l'existence d'au moins cinq (et probablement sept) groupements déterminants différents dans la molécule des globulines γ humaines. Ces résultats ont été obtenus par l'emploi de sérum de chevaux et de lapins immunisés avec des mélanges de plusieurs sérum humains dits normaux ou de préparation de globulines γ purifiées, et ce sont les différences dans leurs réactions avec des globulines γ , des produits de leur protéolyse ou des protéines de Bence-Jones qui ont permis de mettre en évidence l'existence de groupements déterminants différents.

Des exemples du même phénomène peuvent être tirés des résultats obtenus dans des recherches sur des réactions croisées. Les proportions relatives d'Ac qui réagissent avec un Ag hétérologue varient notablement d'un immunsérum à un autre, ce qui prouve que les animaux forment des quantités relatives variables d'Ac envers des groupements spécifiques différents.

De ce qui précède, on peut conclure que si les réactions quantitatives de précipitation spécifique ont fourni et peuvent fournir des renseignements d'une très grande importance lorsqu'on s'adresse à un seul système précipitant, on est obligé de prendre des précautions dans leur interprétation lorsqu'on étudie des Ag modifiés ou des réactions croisées. En effet, la situation se présente de façon analogue au cas d'immunisation par un mélange d'antigènes. Or, tous ceux qui en ont pratiqué ont constaté que certains animaux ne forment pas d'Ac envers l'un ou l'autre des Ag contenus dans ce mélange. On risque donc de faire une erreur d'interprétation lorsqu'on arrive à épuiser les Ac spécifiques d'un Ag donné par une préparation différente ; on serait enclin à admettre l'identité des deux substances ; or, l'animal dont on a utilisé l'immunsérum aurait pu ne pas former d'Ac envers la partie de la molécule qui distingue les deux produits. Le seul remède, d'ailleurs imparfait, pour s'en assurer serait l'utilisation de plusieurs immunsérum provenant d'animaux ayant été formement immunisés et même peut-être par des méthodes différentes.

Les courbes de précipitation obtenues avec un mélange d'antigènes et l'immunsérum correspondant sont généralement difficiles à interpréter. Dans le cas d'immunsérum de lapin, elles présentent un tracé unique plus ou moins irrégulier et assez étendu (Kaminski ; Cohn et Deutsch ; Kabat, etc.). Elles permettent cependant l'obtention de quelques renseignements, surtout si on procède à des essais supplémentaires, comme l'étude détaillée des liquides surnageants ou des épuisements partiels avec des antigènes purifiés. Avec des immunsérum de cheval, on sait que les courbes de précipitation avec un Ag protéique présentent généralement la forme d'une cloche. Lorsqu'on a affaire à un mélange d'antigènes et l'immunsérum homologue, il arrive par-

fois qu'on observe des sommets plus ou moins séparés, mais généralement ils se chevauchent. Ainsi, en étudiant avec Lapresle la précipitation d'un sérum de cheval hyperimmunisé avec du sérum humain normal, nous n'avons pu observer qu'un seul clocher séparé, que nous avons pu identifier comme étant dû à la sérumalbumine. Le reste de la courbe de précipitation correspondait à une série de clochers confluents. Dans l'espoir de pouvoir identifier les divers constituants du sérum, nous avons utilisé la méthode de double diffusion sur plaques de gélose d'Ouchterlony ; seuls quelques constituants, qu'il est relativement aisés d'obtenir à l'état pur, ont pu être ainsi identifiés parmi les très nombreuses bandes de précipitation que donnait notre immunosérum. Dans le dessein de pouvoir mieux identifier les constituants de mélanges complexes, nous avons mis au point avec C. A. Williams une méthode que nous appelons analyse immuno-électrophorétique (1), qui comporte une électrophorèse dans une plaque de gel, généralement de gélose, et une précipitation spécifique dans ce gel, par double diffusion, comme dans la méthode d'Ouchterlony. L'analyse immuno-électrophorétique permet l'étude de mélanges même très complexes grâce à une double et parfois triple définition des constituants de ces mélanges ; par leurs mobilités électrophorétiques, par leurs réactions spécifiques et parfois par leurs caractéristiques chimiques (emploi de colorants ; réactions enzymatiques). Cette méthode a déjà été utilisée dans un très grand nombre de travaux sur des sujets extrêmement variés tels que : constituants de virus, de microbes, de divers liquides ou tissus de mammifères, des oiseaux, des poissons, des crustacés ; les modifications de ces constituants dans des états pathologiques et au cours du développement embryonnaire ; le clivage des protéines par des enzymes ; les modifications des constituants protéiques de l'orge au cours de la fabrication de la bière, comparaison des constituants des graines de graminées avant et après hybridisation. Nous nous limiterons à deux exemples :

1^o Un très grand nombre d'études a été consacré au sérum humain normal ou pathologique. Actuellement, grâce à l'emploi de sérums de chevaux hyperimmunisés (par les soins de nos collègues de l'Annexe de l'Institut Pasteur de Garches), on arrive à définir dans le sérum humain au moins 24 constituants différents. Un certain nombre de ces substances a pu être identifié à des protéines déjà connues ; l'existence de certaines autres, qui n'ont pas encore pu être isolées, n'a été révélée que grâce à l'emploi de l'analyse immuno-électrophorétique. De plus, cette

(1) Nous aimerais que cette appellation soit réservée aux seules méthodes où les deux opérations (séparation électrophorétique et la réaction de précipitation spécifique) sont effectuées dans la même enceinte.

méthode a permis des comparaisons entre les constituants du sérum et d'autres humeurs ou cellules de l'organisme humain, normal ou pathologique, tels que : liquide céphalo-rachidien, colostrum, lait, urine, liquide synovial, leucocytes, érythrocytes, glande thyroïde, calculs rénaux, etc.

2^o Grâce à l'emploi de la même méthode et d'immunsérumspécifiques du sérum de souris et du sérum de rats, convenablement épuisés pour supprimer toute réaction croisée, il a été possible de démontrer dans les sérum de souris, ayant été irradiées par une dose létale de rayons X et maintenues en survie par des inoculations de suspensions de cellules de la moelle de rats, la présence de certaines protéines spécifiques de l'espèce rat. Ces expériences ont permis de prouver que les cellules de rats ainsi inoculés ont non seulement survécu, mais qu'elles ont continué à synthétiser des protéines qui leur sont spécifiques.

Nous espérons que ces exemples, ainsi que ceux des autres rapporteurs de ce Colloque, permettront de se rendre compte que, malgré les nombreuses lacunes de nos connaissances théoriques sur la réaction protéine-antiprotéine, des progrès réels ont pu être obtenus grâce à son emploi.

HÉTÉROGÉNÉITÉ DES ANTICORPS ANTI-PROTÉINES

par Claude LAPRESLE (*).

(*Service de Chimie microbienne, Institut Pasteur, Paris*)

Nous envisagerons dans ce travail l'hétérogénéité des anticorps anti-protéines qui résulte de différences dans leur spécificité. Le fait que les anticorps formés contre un seul antigène puissent être un mélange d'anticorps de spécificités différentes correspondant sur la molécule d'antigène à des groupements déterminants distincts, a été démontré d'une façon très générale dans le cas des antigènes artificiels [1]. Dans le cas des antigènes naturels, ce fait a été invoqué depuis longtemps [2] pour rendre compte des réactions croisées, mais il faut insister sur deux points : 1° Les réactions croisées démontrent bien l'existence de plusieurs types d'anticorps ; par contre, elles ne démontrent pas de façon aussi rigoureuse que ces anticorps correspondent à des groupements déterminants différents, leur comportement pouvant s'expliquer par des différences d'affinité vis-à-vis d'un même déterminant antigénique. 2° Elles ne s'observent que dans des circonstances relativement limitées et qui ne peuvent pas être modifiées au gré de l'expérimentateur.

Nous avons montré que l'hétérogénéité des anticorps anti-protéine pouvait être mise en évidence et étudiée systématiquement en utilisant comme instrument expérimental l'antigène convenablement dégradé par un enzyme protéolytique. En effet, cette dégradation se fait dans certains cas de telle façon que les groupements déterminants de l'antigène sont séparés et portés par des fragments de molécule différents. Ces fragments se comportent alors comme des antigènes indépendants les uns des autres, réagissant chacun avec leurs anticorps correspondants.

Nous avons établi ce fait en dégradant la sérumalbumine humaine avec un extrait de rate de lapin. Nous avons montré que le sérum de lapin anti-albumine, qui forme avec l'albumine non dégradée un seul système précipitant, forme avec l'albumine dégradée plusieurs systèmes précipitants indépendants les uns des autres [3, 4]. Ultérieurement, nous avons étudié la dégradation de l'albumine par d'autres enzymes protéolytiques. Nous

(*) Chargé de Recherches à l'Institut National d'Hygiène.

avons constaté que l'un d'entre eux, la trypsine, dégrade l'albumine sans séparer ses différents groupements déterminants [5, 6]. Dans ce cas, le sérum de lapin anti-albumine ne forme pas avec l'albumine dégradée plusieurs systèmes précipitants indépendants les uns des autres. Nous commencerons donc par l'étude comparative de ces deux modes de dégradation de l'albumine afin d'analyser les répercussions, sur un système précipitant, de la scission de l'antigène en fragments réagissant indépendamment avec des anticorps différents.

En milieu gélifié, le sérum anti-albumine, qui forme avec l'albumine non dégradée une seule ligne de précipitation, forme avec l'albumine dégradée par un extrait de rate de lapin, trois lignes de précipitation que nous avons dénommées : *a*, *b*, *c*. En immuno-électrophorèse (fig. 1), ces trois lignes qui correspondent à des mobilités électrophorétiques différentes ne se rejoignent pas ; elles sont donc formées par des systèmes précipitants indépendants les uns des autres. Au contraire, l'albumine dégradée par la trypsine forme avec le sérum de lapin anti-albumine deux lignes de précipitation correspondant à des mobilités électrophorétiques différentes et qui se rejoignent partiellement. Nous avons pu isoler les constituants responsables de ces deux lignes [6] et montrer que les uns précipitaient tous les anticorps anti-albumine et les autres une partie seulement de ces anticorps, ce qui explique l'image de réaction croisée observée en immuno-électrophorèse.

En milieu liquide, il est possible dans les deux cas de précipiter tous les anticorps anti-albumine avec l'albumine dégradée, mais la quantité de précipité spécifique obtenu dans ces conditions est très différente d'un cas à l'autre (fig. 2).

Dans le cas de l'hydrolyse trypsique, du fait que les produits de dégradation précipitent, les uns tous les anticorps anti-albumine et les autres une partie de ces mêmes anticorps, tout se passe comme si le milieu en réaction s'appauvrisait en antigène sans que le pouvoir précipitant de celui-ci soit pratiquement diminué. Il est nécessaire d'ajouter plus d'albumine dégradée que d'albumine non dégradée pour précipiter tous les anticorps anti-albumine, mais la quantité de précipité spécifique obtenu dans ces conditions diminue très peu [5, 6].

Dans le cas de la dégradation de l'albumine par un extrait de rate de lapin, la quantité de précipité spécifique obtenue lorsque tous les anticorps anti-albumine sont précipités est très inférieure à celle obtenue avec l'albumine non dégradée [4]. Ceci est lié au fait que la courbe de précipitation spécifique obtenue avec l'albumine dégradée par un extrait de rate de lapin correspond à la somme de trois courbes ayant des points d'équivalence différents. Nous l'avons démontré en analysant en milieu gélifié les surnageants de telles courbes et en montrant qu'ils contenaient

trois anticorps épuisés les uns après les autres et trois antigènes apparaissant les uns après les autres [4].

On voit donc que la diminution de précipité spécifique qui s'observe lorsque l'albumine est dégradée avec un extrait de rate de lapin est liée à la qualité de la dégradation et non à son

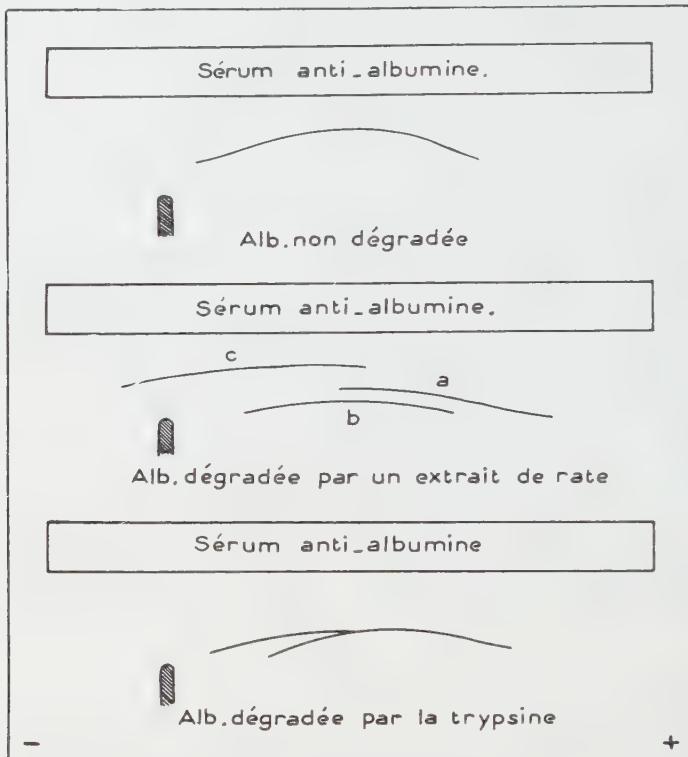


FIG. 1. — Reproduction schématique des immuno-électrophorèses n° 1, 3 et 12 de la figure 1 du *J. Immunol.* (1959, **82**, 94). Le degré de dégradation de l'albumine, mesuré par le pourcentage d'albumine non précipitable par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 est le suivant : albumine dégradée par un extrait de rate de lapin, 20 p. 100 ; albumine dégradée par la trypsine, 50 p. 100.

importance. Ce fait, que nous avons vérifié avec d'autres enzymes protéolytiques [5], permet de suivre la scission d'un antigène en fragments précipitant avec des anticorps différents [7]. C'est ce que montre (fig. 2) la comparaison des courbes obtenues en dosant le précipité spécifique formé à la limite de la zone d'excès d'anticorps par des échantillons d'albumine dégradée avec la trypsine et avec un extrait de rate de lapin. Dans le cas de l'hydrolyse

trypsique, cette courbe reste pratiquement horizontale. Au contraire, dans le cas de la dégradation de l'albumine par un extrait de rate de lapin, cette courbe présente deux portions : une première portion descendante qui correspond à la scission de l'albumine en fragments précipitants différents, et une deuxième portion

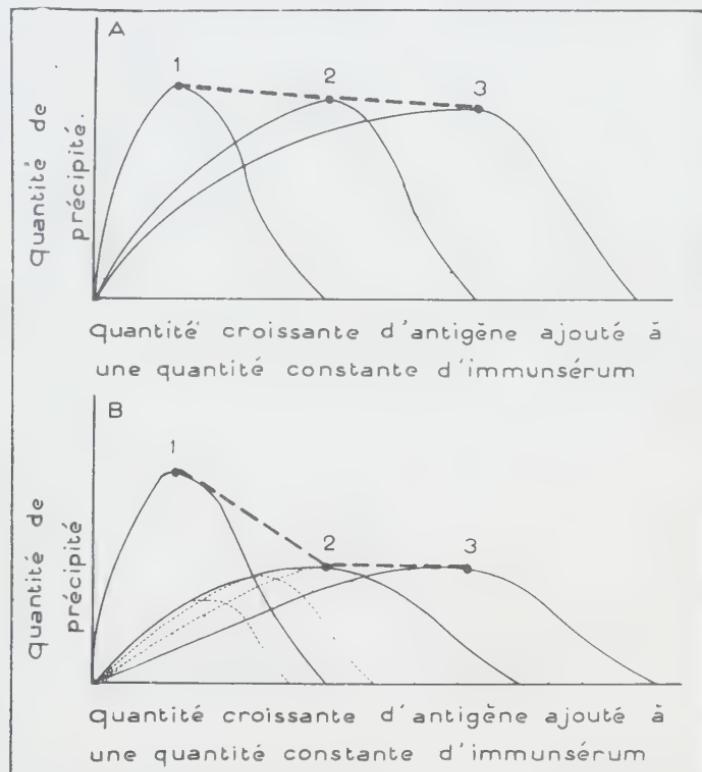


FIG. 2. — Représentation schématique de l'évolution du système précipitant formé par l'albumine et le sérum de lapin anti-albumine lorsque l'albumine est dégradée par un enzyme protéolytique. En A la dégradation se fait sans scission de l'albumine en fragments précipitant indépendamment les uns des autres (cas de la trypsine) ; en B, la dégradation entraîne une scission de l'albumine en trois groupes de fragments différents précipitant indépendamment les uns des autres (cas d'un extrait de rate de lapin). Les lignes pointillées correspondent au schéma des courbes obtenues en dosant le précipité spécifique à la limite de la zone d'excès d'anticorps.

horizontale qui correspond à la poursuite de la dégradation une fois cette scission achevée.

Le point anguleux qui sépare les deux portions de cette courbe a plusieurs propriétés intéressantes : 1° Il est facile à déterminer

car la limite de la zone d'excès d'anticorps d'un système précipitant est nettement marquée ; de plus une légère erreur dans son appréciation serait de peu de conséquence parce que la courbe de précipitation spécifique formée par l'albumine dégradée est plate [4]. 2° Il est lié à un stade défini de dégradation de l'antigène, celui où ses groupements déterminants ont été séparés les uns des autres ; il ne dépend donc pas de l'immunsérum utilisé à condition que celui-ci contienne tous les anticorps précipitant avec ces groupements, fait que nous avons vérifié expérimentalement [8]. 3° Il correspond au stade où la scission en fragments précipitants différents est achevée pour toutes les molécules d'antigène, c'est-à-dire à un stade où toute l'albumine a été dégradée ; ce fait, que nous avons vérifié par ultracentrifugation [9], nous a permis d'étudier le pouvoir antigénique des fragments d'albumine sans qu'interfère la présence d'albumine non dégradée [10]. 4° Il permet de relier à une modification chimique aisément reproductible le stade de dégradation où l'antigène est scindé en fragments précipitants différents. Ce point est particulièrement important car au fur et à mesure que la dégradation par l'extrait de rate de lapin se poursuit, les fragments d'albumine perdent leur caractère précipitant, tout en conservant leur capacité de se combiner avec les anticorps anti-albumine. Il devient alors impossible de les étudier directement par les méthodes de précipitation spécifique et il est donc très utile de pouvoir déterminer le stade auquel la dégradation doit être arrêtée pour obtenir un hydrolysat précipitant encore avec tous les anticorps anti-albumine.

L'albumine convenablement dégradée constitue ainsi un réactif permettant d'étudier les différents anticorps anti-albumine comme le montrent les exemples suivants : 1° Nous avons étudié la composition qualitative du sérum chez 9 lapins immunisés avec l'albumine dans les mêmes conditions et nous avons montré que leurs sérums, dont le taux total d'anticorps anti-albumine variait du simple au double, contenaient tous les mêmes trois types d'anticorps mais en proportion variable d'un sérum à l'autre [8]. 2° Nous avons, en milieu géligé, analysé avec l'albumine dégradée les surnageants de la courbe de précipitation spécifique formée par le sérum de lapin anti-albumine avec l'albumine non dégradée et nous avons montré qu'ils contenaient trois anticorps et que ceux-ci étaient épuisés les uns après les autres par l'albumine non dégradée [4]. Puisque les proportions relatives des différents anticorps varient d'un sérum à l'autre, il est possible qu'ils soient épuisés d'une façon variable d'un sérum à l'autre ; ceci pourrait expliquer les différences de formes et la plus ou moins grande étendue de la zone d'équivalence observées dans les courbes de précipitation spécifique d'un antigène protéique avec des immun-

sérum différents. 3° Nous avons révélé avec l'albumine dégradée une immuno-électrophorèse faite avec un sérum de lapin anti-albumine et nous avons constaté que ce sérum formait trois lignes de précipitation correspondant à des mobilités électrophorétiques légèrement différentes [4] ; ces différences de mobilité sont trop faibles pour être sûrement significatives, mais cette expérience montre qu'il est possible d'étudier ainsi les mobilités électrophorétiques des différents anticorps formés contre une molécule protéique.

Lorsque nous avons montré qu'il était possible avec l'albumine dégradée par un extrait de rate de lapin de précipiter tous les anticorps anti-albumine, nous en avons déduit que ceux-ci n'étaient faits que du mélange des trois catégories d'anticorps précipitant avec l'albumine dégradée dans ces conditions. Mais nous avons réservé la possibilité que ces catégories d'anticorps se révèlent à leur tour hétérogènes si d'autres enzymes étaient utilisés pour dégrader l'albumine [4]. C'est effectivement ce que nous a montré l'étude de la dégradation de l'albumine par différents enzymes protéolytiques [5]. Cette étude a été rendue particulièrement aisée par l'emploi de l'immuno-électrophorèse, car les produits de dégradation de l'albumine ont des mobilités électrophorétiques nettement différentes, ce qui permet de les identifier facilement. Nous avons observé, dans ces conditions, les faits suivants (fig. 3) : la dégradation de l'albumine par la pepsine entraîne la formation de trois lignes de précipitation, *a*, *b*, *c*, analogues à celles formées par l'albumine dégradée avec un extrait de rate de lapin. La chymotrypsine, agissant à pH 4,5, entraîne la formation de trois lignes de précipitation, mais celles-ci n'ont pas toutes le même aspect que précédemment ; la ligne *a* est plus petite et la ligne *c* est plus longue. Lorsque la dégradation chymotrypsique est plus importante, on atteint un stade de dégradation où ne s'observe plus que la ligne *c*. Nous avons alors épuisé un sérum anti-albumine avec ce dernier hydrolysat et nous nous sommes servi du sérum ainsi épuisé pour révéler une immuno-électrophorèse faite avec l'hydrolysat pepsique. On voit que, dans ces conditions, non seulement la ligne *c* a disparu, mais aussi la partie de la ligne *a* voisine de la ligne *c*. Ce fait démontre l'hétérogénéité des anticorps formant la ligne *a* avec l'hydrolysat pepsique.

La situation respective probable sur la molécule d'albumine des groupements déterminants correspondant à ces différents anticorps est représentée de façon schématique sur la figure 4. Nous avons supposé que la ligne *b* était formée par un groupement déterminant *b* que nous avons placé à distance des autres pour les raisons suivantes : il est scindé le premier au cours de la dégradation enzymatique, à la suite de l'action de trois enzymes différents agissant à leur pH optimum, et il donne lieu à une

ligne de précipitation ayant, en immuno-électrophorèse, dans les trois cas, une situation et une densité semblables. Il est donc porté apparemment par des fragments de molécule ayant la même mobilité et précipitant une même quantité d'anticorps. Nous avons supposé par ailleurs que les lignes *a* et *c* étaient dues à

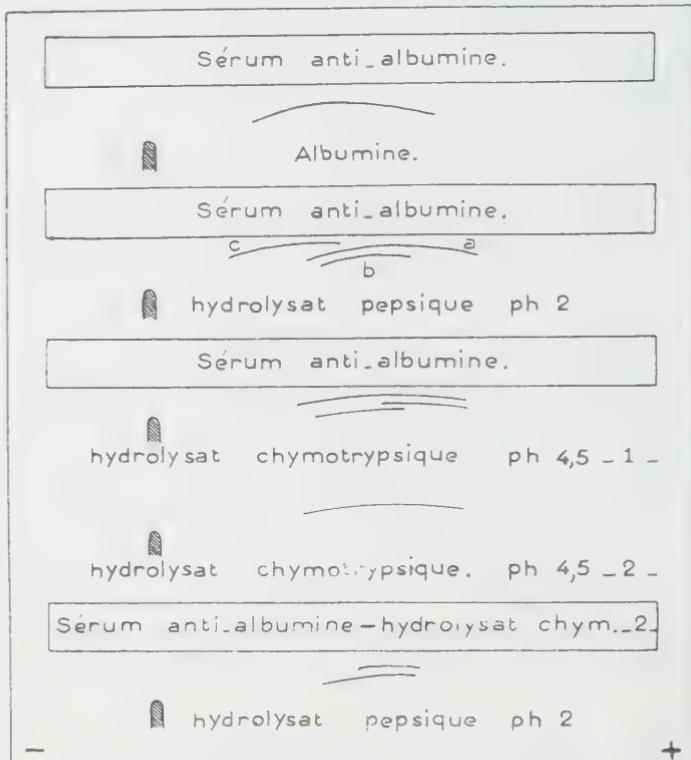


FIG. 3. — Représentation schématique des immuno-électrophorèses n° 1, 4, 9, 10 et 11 de la figure 1 du *J. Immunol.* (1959, 82, 94). Le degré de dégradation de l'albumine, mesuré par le pourcentage d'albumine non précipitée par l'acide trichloracétique à 5 p. 100, est le suivant : hydrolysat pepsique, 4 p. 100 ; hydrolysat chymotrypsique, 1 : 16 p. 100 ; hydrolysat chymotrypsique, 2 : 30 p. 100.

l'existence de trois groupements déterminants distincts, *a*₁, *a*₂, *a*₃, séparés les uns des autres comme il est indiqué sur la figure 4. Le groupement *a*₁ serait responsable de la formation de la ligne *c* par un extrait de rate de lapin ou la pepsine, les groupements *a*₂ et *a*₃ seraient responsables de la formation de la ligne *a* dans les mêmes conditions : l'existence de deux groupements déterminants différents à l'origine de la ligne *a* est suggérée par l'expérience

d'absorption du sérum anti-albumine par l'hydrolysat chymotrypsique. Nous avons placé ces trois groupements côte à côte parce que les densités des lignes *a* et *c* en immuno-électrophorèse semblent toujours inversement proportionnelles ; tout se passe comme si elles étaient formées par la précipitation d'un mélange hétérogène d'anticorps correspondant à un motif antigénique scindé de différentes façons suivant l'enzyme utilisée.

Cette représentation des groupements déterminants de l'albumine est en accord avec les résultats obtenus quand on immunise le lapin avec l'albumine dégradée. En effet, il se forme dans ce cas [10] deux sortes d'anticorps, les uns réagissant avec les groupements déterminants responsables de la ligne *b* et les autres réagissant simultanément avec les groupements déterminants res-

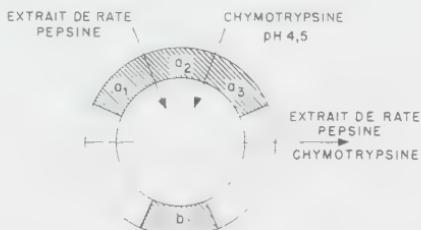


FIG. 4. — Représentation schématique de la structure antigénique de la sérum-albumine humaine et des points d'attaque de différents enzymes protéolytiques (tiré du *J. Immunol.*, 1959, **82**, 94).

ponsables des lignes *a* et *c*. Il est intéressant en outre de signaler que, dans ce cas, les anticorps réagissent aussi avec des groupements nouveaux démasqués par la dégradation enzymatique.

Les groupements déterminants ainsi mis en évidence ne représentent que le nombre minimum de groupements déterminants différents pouvant exister sur la molécule d'albumine. Le nombre total de groupements déterminants est très vraisemblablement plus élevé. En effet, on a montré qu'une molécule d'albumine humaine peut précipiter avec au moins six molécules d'anticorps de lapin anti-albumine [11]. D'autre part, si l'on admet que la précipitation spécifique est due à la formation d'un réseau entre les molécules d'antigène et d'anticorps, les fragments d'albumine qui précipitent avec le sérum anti-albumine doivent pouvoir se combiner avec au moins deux molécules d'anticorps et porter donc chacun au moins deux groupements déterminants. Le fait que ces groupements déterminants ne forment pas de nouveaux systèmes précipitants différents lorsque ces fragments sont à leur tour dégradés peut s'expliquer de deux façons : 1° ces groupements déterminants sont semblables, ou 2° ils sont différents mais n'existent

plus sur des produits de dégradation plus poussée qu'à un seul exemplaire et ont perdu de ce fait leur caractère précipitant.

Les faits que nous avons mis en évidence avec l'albumine humaine ont une portée générale, comme le montrent les résultats analogues obtenus par différents auteurs avec d'autres protéines.

La démonstration avec des toxines dégradées de l'hétérogénéité des antitoxines diptériques [42, 43] et tétaniques est exposée dans ce Colloque par Raynaud et par Turpin. La multiplicité des lignes de précipitation en milieu gélifié obtenue par Pope et Stevens [44] avec la toxine diptérique dégradée par la pepsine ou la trypsine, ou traitée par le phosphate tripotassique ou le tétraversénate de sodium, a vraisemblablement la même signification, bien que ces auteurs ne l'aient pas interprétée de cette façon ; leurs constatations indiquent en outre qu'une hydrolyse chimique peut donner le même résultat qu'une hydrolyse enzymatique. Porter [45] a obtenu avec la chymotrypsine un fragment d'albumine de bœuf qui donnait avec l'albumine non dégradée une réaction croisée suggérant que ce fragment ne portait qu'une partie des groupements déterminants de la molécule d'albumine. Kaminski et Gutierrez [46] ont montré que la dégradation chymotrypsique et trypsique sépare deux groupements déterminants différents sur la molécule d'ovalbumine, tandis que la pepsine dégrade l'ovalbumine sans séparer ses différents groupements déterminants. Scheidegger et Buzzi [47] ont mis en évidence la multiplicité des groupements déterminants des γ -globulines humaines en analysant les systèmes précipitants différents formés par des sérums anti- γ -globulines avec les protéines de Bence-Jones et les sérums de myélomateux ; Burtin [48] a confirmé cette notion et étendu l'étude de ces groupements déterminants en dégradant les γ -globulines humaines avec la trypsine et la chymotrypsine. Tous ces exemples montrent que la protéolyse de l'antigène fournit une méthode générale pour étudier l'hétérogénéité des anticorps antiprotéine et connaître le nombre minimum de groupements déterminants différents des antigènes protéiques. On remarquera cependant que l'agent protéolytique qu'il faut utiliser varie selon la protéine étudiée. Il dépend vraisemblablement de la nature des liaisons séparant les groupements déterminants de cette protéine et ne peut actuellement être choisi que de façon empirique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LANDSTEINER (K.). *The specificity of serological reactions*. Harvard University Press, Cambridge, 1945.
- [2] HOOKER (S. K.) et BOYD (W. C.). *J. Immunol.*, 1934, **36**, 469.
- [3] LAPRESLE (C.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 969.
- [4] LAPRESLE (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 654.

- [5] LAPRESLE (C.), KAMINSKI (M.) et TANNER (C. E.). *J. Immunol.*, 1959, **82**, 94.
- [6] LAPRESLE (C.), WEBB (T.), KAMINSKI (M.) et CHAMPAGNE (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1959, **41**, 695.
- [7] LAPRESLE (C.) et DURIEUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 62.
- [8] LAPRESLE (C.) et DURIEUX (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, 833.
- [9] LAPRESLE (C.) et SLIZEWICZ (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, **40**, 1085.
- [10] LAPRESLE (C.) et DURIEUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 38.
- [11] KABAT (E. A.) et HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1937, **66**, 229.
- [12] RAYNAUD (M.). *Heterogeneity of Diphtheria Antitoxin*. In *The mechanism of hypersensitivity*, Henry Ford Hospital International Symposium, Little, Brown and Company, Boston, 1959.
- [13] RELYVELD (E. H.). *Thèse Doct. ès-sciences*, Univ. de Paris, 1958.
- [14] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1958, **39**, 150.
- [15] PORTER (R. R.). *Biochem. J.*, 1957, **66**, 677.
- [16] KAMINSKI (M.) et GUTTIERREZ (O.). *V^e Journées Biochimiques Latines*, Barcelone, 1959.
- [17] SCHEIDECKER (J. J.) et BUZZI (C.). *Rev. Franç. Etudes clin.*, 1957, **2**, 895.
- [18] BURTIN (P.). (Résultats non publiés.)

LA RÉACTION TOXINE-ANTITOXINE DIPHTÉRIQUES (*) (**)

par M. RAYNAUD et E. H. RELYVELD
(avec la collaboration technique de M^{les} A. COUZINET
et O. BEPOL DIN).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

Très peu de temps après la découverte de la toxine diphtérique par Roux et Yersin en 1899 [100], von Behring et Kitasato [3] établissaient l'existence dans le sérum des sujets qui ont résisté à l'infection diphtérique, d'une antitoxine spécifique neutralisante. On connaît toute l'importance de cette découverte, qui fut à la base du développement de la sérothérapie. La préparation de l'antitoxine par emploi du cheval, après des progrès assez lents d'abord, fut considérablement améliorée par la découverte de l'anatoxine par Ramon [73, 76, 77, 78, 79], et par l'emploi systématique d'animaux présentant une immunité antidiphétique de base naturelle [2, 20, 34, 83, 105].

L'utilisation des adjuvants non spécifiques [23, 24, 25, 26, 27, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 103, 104] permit une amélioration supplémentaire.

Grâce à ces diverses recettes, les sérum antidiphétiques thérapeutiques sont actuellement des sérum de titre élevé, présentant les caractères de sérum avides. Ils sont doués d'un haut pouvoir neutralisant qui est parallèle à leur pouvoir précipitant. Les titrages *in vivo* par la méthode classique d'Ehrlich et *in vitro* par la méthode de flocculation de Ramon, donnent des résultats concordants, leurs rapports L+/Lf étant voisins de 1.

Les premières études d'immunologie quantitative dues à Pappenheimer [56, 57], puis à divers autres auteurs [6, 15, 16, 63, 64, 66], ont été effectuées sur des sérum de ce type. Elles ont con-

(*) Les travaux rapportés ici ont été exposés en partie dans la thèse de l'un d'entre nous [95].

(**) Abréviations :

Lf (T) = unité de flocculation de toxine diphtérique.

Lf (A) = unité de flocculation d'antitoxine antidiphétique.

T = toxine intacte.

TD = toxine digérée partiellement par la trypsine.

Lf (TD) = unité de flocculation de toxine digérée.

duit à une représentation simple de la nature de l'antitoxine anti-diphétique et ont amené à considérer comme un axiome, que la toxine diphétique (ou l'anatoxine) donnait toujours naissance à des anticorps capables de la neutraliser.

Le système toxine-antitoxine diphétique apparaissait ainsi comme un système modèle. Le progrès des techniques ayant permis de déceler des concentrations extrêmement faibles d'antitoxine neutralisante, ce système modèle a été utilisé par de très nombreux chercheurs pour l'étude de problèmes immunologiques très divers, allant de l'avidité à l'allergie. Mais tous ces travaux reposent sur le principe, qui n'est pas toujours explicitement exprimé, qu'il y a identité absolue entre antitoxine et pouvoir neutralisant, autrement dit que même la plus faible réponse immunitaire chez l'animal qui a reçu, comme antigène, de la toxine ou de l'anatoxine, ne peut être que la production d'anticorps neutralisants. Comme, par ailleurs, la toxine, et mieux, l'anatoxine, convenablement administrées sont effectivement de bons antigènes, qui font apparaître assez précocement des anticorps neutralisants, cette hypothèse paraissait largement confirmée.

Nous nous proposons de montrer ici que cette situation simple recouvre une réalité beaucoup plus complexe. L'ensemble des faits nouveaux que nous présenterons conduit naturellement à une hypothèse qui se rattache à celle qu'a développée Lapresle et qui peut se résumer ainsi. Il existe, sur la molécule de toxine diphétique, plusieurs groupes déterminants ou sites antigéniques, distincts les uns des autres par leur spécificité. Le nombre de ces catégories de sites est de trois au minimum. Certains d'entre eux donnent naissance à des anticorps qui, bien qu'ils soient capables de donner une combinaison spécifique avec la toxine diphétique, sont incapables de la neutraliser. Un de ces sites au moins donne naissance à des anticorps neutralisants.

Nous avons abordé cette étude en passant par les stades suivants :

I. — PRÉPARATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE PURE. — Le mode de préparation et les propriétés de la toxine ont été rapportés plus haut [97]. Nous n'y reviendrons pas ici. Notons seulement qu'on est en droit de considérer la toxine diphétique titrant 3 000-3 200 Lf/mg N comme une protéine homogène, ne contenant que des traces de protéines antigéniques contaminantes. Son poids moléculaire est voisin de 70 000.

II. — IMMUNISATION DE CHEVAUX AVEC UNE ANATOXINE PURE (dérivée de la toxine pure par action du formol) ADSORBÉE SUR ADJUVANT (phosphate d'alumine, ou mieux, phosphate de calcium) [89].

Deux groupes de chevaux ont été immunisés :

a) Un groupe présentant une immunité de base (à Schick négatif) [93] ;

b) Un groupe dépourvu d'immunité de base (à Schick positif) [88].

Des prélèvements ont été faits à diverses périodes de l'immunisation.

L'identification de l'antitoxine (ou plus exactement des anticorps précipitant avec la toxine diphtérique) est facile par l'immu-

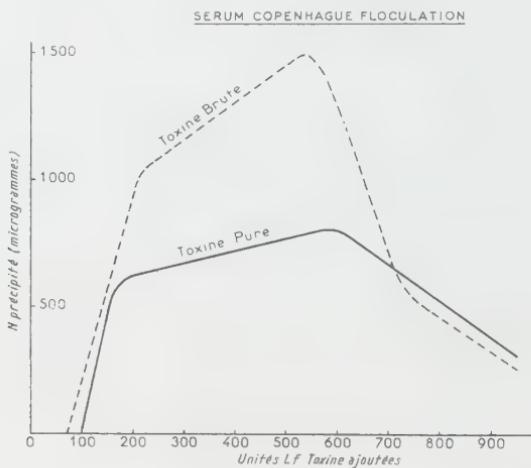


FIG. 1.

noélectrophorèse [30, 31, 32, 412, 413], qui permet en même temps de déterminer la mobilité électrophorétique des anticorps.

Grâce à la toxine pure, il est aisément vérifiable que la plupart des sérums commerciaux contiennent un grand nombre d'anticorps, que nous proposons d'appeler anticorps accessoires, dirigés contre divers antigènes autres que la toxine (antigènes accessoires) présents dans les anatoxines brutes. Nous appelons ces sérums « sérums complexes ».

Pope a déjà insisté [63, 64] sur l'importance de ces observations. Les courbes de précipitation établies avec un sérum complexe et une toxine partiellement purifiée ou brute peuvent conduire à des déterminations très erronées de l'azote total précipitable (fig. 1).

Finger et Kabat ont fait des observations analogues chez l'homme [19].

Les sérum que nous avons préparés ne contiennent que de très faibles quantités d'anticorps accessoires, qui peuvent être, si on

TABLEAU I. — Caractères des sérum utilisés. Sérum à γ -antitoxine prédominante.

Sérum	Date	Lf/ml	L+/Lf	Antitoxine beta 2 gamma	Lf/mg N	N % préci- p. tib.	Nombre de const.	Kf
341 Début	21/5/55 11° J	150	1,37	+	+++	10,95	3,47	1(+1)
1451 Début	Mélange 12°-43° J	202	1,60	+	+++	18	4,32	1
441 Début	14/10/55 17° J	140	2,90	+	+++	11,8	5,20	1(+2)
441 Fin	9/11/55 43° J	225	1,89	+	+++	17	7,5	1(+2)
441 S 1 n° 1	29/11/56	50	4,86	0	+++	11	7,50	1(+1)
441-S 1 n° 2	25/1/57	100	2,50	±	+++	16,9	7,25	1(+1)
441-S 1 n° 3	21/2/57	120	2,30	+	+++	17,7	7,17	1(+1)
441-gamma	18/3/57	190	1,00	0	gamma	400	65,7	1
Lapir. 5 D	12/3/57	60	0,91	0	+++	5,45	1,82	1(+2)
Mouton n°4 digéré		756	3,44*	0	γ's			+ de 8
Mouton n°5 brut		160	3,75*	0	γ's	11,65	5,90	+ de 8
Mouton n°5 digéré		750	4,12*	0	γ's	26,2	17,1	+ de 8

* Rapport Lr/Lf; ** En établissant la courbe de précipitation avec une toxine à 2 800 Lf/mg N, nous avions trouvé 9,3 p. 100 pour le sérum 441 Fin [92].

le désire, complètement éliminés par digestion pepsique du précipité spécifique (1).

Pour les sérum non digérés, tels que nous les avons préparés, on peut cependant considérer que l'influence des anticorps acces-

(1) On obtient ainsi une préparation qui est rigoureusement dépourvue d'anticorps accessoires (sérum à 1 zone).

soires est négligeable. Les propriétés générales des sérum utilisés sont rapportés dans les tableaux I, II, III, IV.

On voit que les anticorps précipitants antidiphthériques sont d'abord localisés dans les γ -globulines, puis à la fois dans les γ -globulines et les β_2 -globulines ($\beta_2 = \gamma_1 = T$), et enfin unique-

TABLEAU II. — Caractères des sérum utilisés. Sérum à β_2 -antitoxine prédominante.

Sérum	Date	Lf/ml	L+/Lf	Antitoxine β_2 gamma	Lf/mgN	N % préci- pitab.	Nombre de const.	K \ddagger
Copenhague antitox.		Dessé- ché	1,00	+++ +	100	23,9	+ie 10	60*
Copenhague floucat.		500	1,00	+++ +	132	20,2	+de 8	15*
341 Fin	17/6/55 39° J	1100	0,90	+++ +	84	17,8	1(+2)	30*
1451 Fin	14/5/54 82° J	540	0,90	+++ +	45	6,75	1(+2)	70*
1451-S _c n° 1 NaCl 0,140M	4/1/57	500	0,85	+++ 0	93	15	1(+2)	40*
1451 Fract. solub. 1,4M	*	270	0,85	+++ 0	45	6,96	1(+1)	60*
441-S2	12/11/57	200	1,75	+++ +	29,3	10,7	1(+1)	145*

* La courbe de cette fraction a été établie en tampon $\text{PO}_4\text{KH}_2/\text{K}_2\text{H}$, pH = 6,8, de concentration 1,40 M.

ment dans les β_2 -globulines. Les sérum hyperimmuns commerciaux ne contiennent que des β_2 -antitoxines, ou des β' -antitoxines (Cf. plus loin).

Les auteurs antérieurs ont en général limité leur attention à ces sérum commerciaux, bruts ou digérés. Ils n'ont donc étudié qu'une des éventualités observables au cours de l'hyperimmunisation des chevaux.

D'autre part, on sait qu'après digestion par la pepsine, les β_2 -globulines sont transformées en fragments (1/2 ou 1/3 de molécule) [54, 59, 60, 62, 99, 101, 102, 114], dont la mobilité est très diminuée et se trouve alors voisine de celle des γ -globulines naturelles.

Nous proposons pour les β_2 -globulines digérées la dénomination de globuline β' [87].

TABLEAU III. — Caractères des sérum utilisés. Sérum à β' -antitoxine (sérum digérés).

Sérum	Date	Lf/ml	L+/Lf	Lf/mg N	N % précipi-table	Nombre de const.	Kf
5355-A *	Ré lange	6514	0,87	218	29,9	1(+1)	3*
906 NaCl φ	Ré lange	1700	0,86	108	15,2	+ ie 6	5*
906 (1,0 M)	Ré lange	1700	0,86	108	21,6	+ ie 6	
1451	14/6/53 30° J	~15	0,56	70	5,-	3	50*
1451-beta ¹ n°1(NaCl φ)**	11/3/57	200	1,00	620	70	1	2*
1451-beta ¹ n°1(1,0 M)**	11/3/57	200	1,00	620	70,5	1	
1451-beta ¹ n°2(1,0 M)**	17/6/57	750	0,80	520	71,5	1	1e*

(NaCl φ) Courbe établie en tampon borate 0,2 M, pH = 7,0 + NaCl 0,175 M (1,0 M) Courbe établie en tampon PO₄KH₂/K₂H, pH = 6,8, de concentration 1,0 M ;

* Ce sérum nous a été aimablement envoyé par A. M. Pappenheimer ; ** Les fractions β' -prime du sérum 1451 ont été obtenues par digestion pepsique du précipité spécifique.

TABLEAU IV. — Caractères des sérum utilisés. Sérum de chevaux à Schick positif.

Fractions	Date	Lf/ml	alpha= L+/Lf	beta 2	gamma	Lf/mg N	N % précipi-tab.	Nombre de const.	Kf
825	8/3/57 30° J	670	0,32 0,22**	++	++	47,5	8,1	1(+1)	90*
825-S1	1/6/57	135	0,56	0	+++	25,6	8,34	1(+1)	10*
825-S2 n° 1	1/6/57	525	0,24	+++	(+)	94	15,4	1(+1)	40*
825-S2 n° 2	1/6/57	175	0,23	+++	+	75	11,9	1(+1)	-
854	22/4/57 25° J	300	0,38	++	++	24,8	5,5	1(+2)	75*
854	29/3/57 60° J	600	0,88	+++	+	48	11,9	4	75*

** Rapports $\alpha' = Lr/Lf$.

Sur la base de leur mobilité, elles sont souvent appelées par les auteurs ou les firmes qui les préparent, solutions de « γ -globuline purifiée », terme qui est doublement impropre. Elles ne sont pas purifiées, mais digérées. Ce ne sont pas des γ -globulines : elles ont gardé en effet les caractères immunologiques des β_2 -globulines anticorps dont elles dérivent, à savoir la propriété de donner une courbe de type flocculation, comme nous le verrons plus loin. Les γ -globulines peuvent aussi être digérées sous forme brute (sérum ou plasma total) ou sous forme de précipité spécifique. Elles sont alors transformées en globulines γ' de mobilité inférieure à celle des γ -globulines natives. Cette modification a été observée chez le mouton [98].

La localisation initiale dans les γ -globulines, plus tardive dans les β_2 -globulines, est indépendante de l'existence d'une immunité de base préalable.

Elle s'observe aussi bien chez les chevaux à Schick positif que chez les chevaux à Schick négatif.

Par contre, l'évolution relative des pouvoirs neutralisant et précipitant est très différente chez ces deux types de chevaux.

Dans le cas des chevaux à Schick négatif, le pouvoir neutralisant augmente plus ou moins parallèlement au pouvoir précipitant. Le rapport $L+/Lf$ est toujours supérieur à 1. Il peut être parfois très élevé (cheval 441, fraction S 1, moutons de Hollande).

Dans le cas des chevaux à Schick positif, le pouvoir précipitant augmente plus vite que le pouvoir neutralisant. Pendant une longue période de leur hyperimmunisation, les sérum de ces chevaux présentent un rapport $L+/Lf$ très bas et un rapport de dilution, exprimé dans la notation de Cinader, très élevé (2). Ils sont doués d'une faible avidité.

(2) Glenny [28, 29] a défini le rapport de dilution comme le rapport des quantités de sérum correspondant au mélange Lr et au mélange $Lr/1\,000$ ou $Lr/10\,000$ multiplié par le facteur de dilution.

Les sérum non avides ont un rapport de Glenny inférieur ou égal à 1.

Cinader [41, 42 43] donne une définition plus simple. On détermine le titre du sérum en opérant en milieu concentré ($Lr/1$, $Lr/10$ ou $L+/1$, $L+/10$), soit t_0 UI/ml, et en opérant en milieu dilué ($Lr/100$, $Lr/1\,000$, $Lr/10\,000$ ou $L+/100$, soit t_1 UI/ml). Le rapport de Cinader t_0/t_1 est l'inverse du rapport de Glenny.

Pour les sérum avides t_0 est égal ou légèrement inférieur à t_1 . Le rapport de Cinader est inférieur ou égal à 1.

Pour les sérum non avides, le titre t_0 est très supérieur au titre t_1 . Le rapport de Cinader est très nettement supérieur à 1.

Les valeurs comprises entre 1 et 1,20 ne sont pas très significatives. Les sérum de faible avidité ont souvent des rapports de Cinader égaux à 2 ou 5, parfois 10.

Comme tous les sérums non avides, ils donnent avec la toxine des complexes qui sont neutres en milieu concentré (niveau Lr/1 ou Lr/10) et toxiques en milieu dilué (niveau Lr/1 000 ou Lr/10 000). Si bien que le titre du sérum varie considérablement suivant les conditions expérimentales de l'essai (*Cf.* sérum 825).

Rapports de dilution.

	TITRE LR/10/TITRE LR/1000
906	0,96
1451	1,00
825-39°	4,00
854-25°	5,00
854-60°	2,00

Il faut noter ici que l'on a en général étudié les sérums non avides après une très courte immunisation. Les études de Jerne [35] sur l'avidité ont été faites en déterminant le pouvoir neutralisant du sérum chez le cobaye après une ou deux injections immunitaires. C'est que l'on admettait implicitement que les anticorps non avides ne constituent qu'une phase transitoire dans l'évolution de la réponse immunitaire, et qu'ils devaient être avides par répétition du stimulus antigénique. Cette affirmation est exacte dans les conditions où l'on se place habituellement et qui, tenant compte de multiples observations empiriques, sont analogues à celles de la vaccination humaine : deuxième injection le quinzième jour après la première et injection de rappel après une période plus ou moins longue, sans stimulation antigénique. Cela revient à immuniser (injection de rappel) un cheval déjà pourvu d'une immunité de base plus ou moins ancienne.

Barr et Glenny, en 1945 [2], ont longuement insisté sur la nécessité de laisser une période suffisante entre la première série d'injections et l'hyperimmunisation, chez le cheval, pour obtenir des anticorps antitoxiques avides.

Les chevaux à Schick positif hyperimmunisés ne peuvent pas être considérés comme des animaux en réponse primaire proprement dite. Mais ils ont été soumis à une stimulation antigénique intense sans période d'arrêt (deux injections par semaine de doses croissantes). Il semble bien que l'absence d'arrêt dans la stimulation antigénique maintient ces animaux dans un stade particulier, en empêchant ou retardant une certaine « maturation » du système formateur d'anticorps.

Quoi qu'il en soit, ces chevaux sont capables de synthétiser pendant une longue période des quantités très élevées d'anticorps qui présentent tous les caractères des anticorps non avides, que l'on peut ainsi obtenir en concentration suffisante pour les étudier en détail.

III. — ÉTABLISSEMENT DES COURBES DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE DES SÉRUMS AVEC LA TOXINE PURE.

A. — La technique employée est la technique classique de Heidelberger [33]. Nous avons opéré dans des conditions analogues à celles utilisées par Pappenheimer [56] et qui ont été décrites en détail ailleurs [96].

Signalons ici seulement que sur un échantillon de précipité spécifique spécialement préparé à cet effet, nous avons recherché la toxine non neutralisée présente éventuellement dans le précipité spécifique. Ce dernier a été remis en suspension en eau physiologique peptonée. Diverses dilutions de cette suspension ont été injectées à l'animal. Cette technique permet une évaluation approximative de la toxine non neutralisée présente dans le précipité spécifique [96].

Les courbes ont été établies, comme celles des divers auteurs qui nous ont précédés, à taux de sérum constant et taux d'antigène variable.

La comparaison entre les divers sérums est assurée par le fait que les courbes de sérums différents sont faites avec la même concentration totale d'antitoxine *exprimée en unités de flocculation*. Ce point particulier n'a pas été l'objet jusqu'à ce jour d'un examen suffisamment attentif, comme l'a noté Marrack [51].

Il pose en effet deux problèmes distincts qu'il nous faut étudier avant de passer à l'examen des courbes :

1^o Le titre flocculant d'un sérum antidiptérique est-il défini sans ambiguïté ?

2^o Le taux d'azote précipitant correspondant à 1 unité de flocculation de sérum est-il identique d'un sérum à l'autre ?

Notons au préalable que l'unité Lf de toxine n'est pas affectée par ces considérations. Elle est définie en effet par référence à un sérum déterminé, l'étalement international de flocculation. Nous avons vérifié que ce dernier donne les mêmes résultats dans les conditions les plus diverses.

- a) Technique Ramon, volume variable.
- b) Technique Dean et Webb, volume variable.
- c) Technique Ramon, volume fixe.
- d) Technique Dean et Webb, volume fixe.
- e) Technique γ (*Cf.* plus loin).

Les écarts systématiques qui peuvent résulter de variations dans le détail de la technique utilisée pour la flocculation sont très faibles (± 5 p. 100). La toxine est d'ailleurs titrée en général par la technique Ramon, volume variable.

Ces observations expliquent qu'il y ait un très bon accord entre les divers laboratoires pour les données relatives aux caractères

de la toxine pure (3). 1 Lf de toxine pure correspond sensiblement à 0,322 µg N (toxine : 3 100 Lf/mg N).

B. *Etude de la flocculation initiale.* — La définition du titre flocculant d'un sérum n'est pas dépourvue d'ambiguïté si l'on ne précise pas, jusque dans de nombreux détails, la technique employée pour sa détermination.

On connaît l'abondante littérature qui a été consacrée au défaut de concordance des résultats obtenus par emploi de la technique β (antigène constant) [70, 71, 72, 73, 74, 75, 76] et α (anticorps constant) [17] pour la recherche du rapport antigène/anticorps, donnant la flocculation la plus rapide (flocculation initiale) [10, 21, 50, 106, 107, 108, 109].

Boyd [7, 8, 9] a construit les surfaces représentant les relations entre le temps de flocculation, le rapport antigène/anticorps et la concentration pour divers sérums. Il est arrivé à la conclusion que pour certains sérums, il y avait toujours discordance entre les deux techniques et que d'autres sérums ne présentent de minimum du temps de flocculation que lorsqu'on utilise la technique α .

Il semble bien que ces conclusions doivent être entièrement révisées à la suite des travaux de Bowen et Wyman [4, 5].

Bowen et Wyman ont montré que, dans la plupart des arrangements pratiques de tubes et de dilution utilisés pour la détermination de la flocculation initiale, l'expérimentateur, tout en croyant ne faire varier qu'un seul facteur, le rapport antigène/antigène, faisait aussi varier la concentration totale (antigène + anticorps). Or le temps de flocculation dépend de très nombreux facteurs. Les uns, non spécifiques, peuvent être et sont effectivement maintenus constants facilement : pH des liquides de dilution, force ionique totale, température, etc. La variation du rapport antigène/anticorps est toujours contrôlée et exactement reconnue.

Par contre, la variation de concentration totale est en règle complètement méconnue. Or, on a depuis longtemps constaté que si l'on faisait varier la concentration totale antigène + anticorps, le rapport antigène/anticorps étant maintenu constant, le temps de flocculation diminuait lorsque la concentration totale augmentait, suivant la formule empirique suivante :

$$(1) \quad \log. Tf = a - b \log. (A + T)$$

[4, 5, 18, 48, 52, 53].

(3) Il n'en est pas de même lorsqu'une toxine inconnue est titrée par le relai d'un étalon local intermédiaire, si ce sérum intermédiaire n'a pas exactement le même comportement que l'étalon international dans la réaction de flocculation (voir plus loin).

La figure 2 empruntée à un travail qui paraîtra ultérieurement illustre cette observation [90].

Les valeurs a et b sont des constantes qui dépendent de chaque couple toxine-sérum considéré.

Bowen a montré (et nous avons pu confirmer ses conclusions avec une série de sérums de types très variables) que si l'on s'arrange pour maintenir constante la concentration totale ($A + T$) dans toute la série des tubes expérimentaux, en ne faisant varier

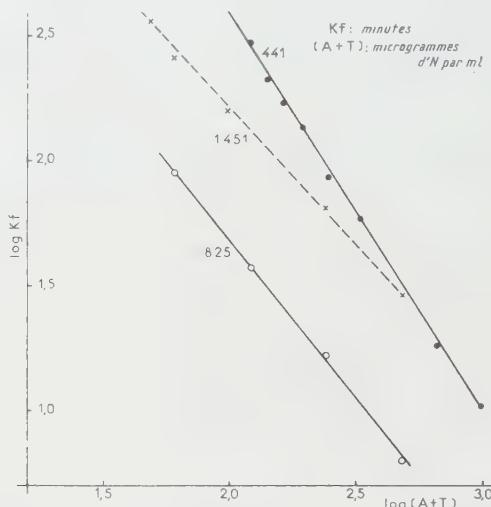


FIG. 2.

que la proportion T/A (anticorps/anticorps), les phénomènes sont considérablement simplifiés.

1° Avec tous les sérums, on observe un minimum du temps de flocculation, pour une certaine valeur privilégiée du rapport T/A .

2° Cette valeur privilégiée est unique : on trouve le même résultat avec la technique Ramon et la technique Dean et Webb.

Lorsqu'il existe des divergences entre ces deux techniques, ces divergences sont dues à une variation surajoutée et méconnue de la concentration totale.

A titre d'exemple, nous avons calculé d'après nos courbes de précipitation quantitative, les concentrations totales exprimées en microgrammes d'azote par millilitre (N toxine + N anticorps précipitable) dans le cas de 4 types de dispositions courantes de tubes pour la flocculation, pour un sérum à β_2 -anticorps.

(1 Lf A = 1,50 µg N) [tableau VI], et pour un sérum à γ -antitoxine prédominante (1 Lf A = 4,52 µg N) [tableau V].

On peut voir que la concentration totale varie considérablement d'un tube à l'autre dans les techniques β à volume constant et α à volume variable, relativement moins dans la technique α à volume constant et β à volume variable.

TABLEAU V. — Sérum 441 (γ -antitoxine prédominante).

Volume ajouté Toxine(Tech.alpha) Sérum (Tech.beta)	Technique beta			Technique alpha		
	Volume total variable	T/A*	Volume total constant	Volume total variable	T/A*	Volume total constant
0,1	102	5	30	381	0,2	114
0,2	152	2,5	53	332	0,4	116
0,3	189	1,66	75	294	0,6	117
0,4	219	1,25	98	266	0,8	119
0,45	231	1,11	109	252	0,9	120
0,50	242	1,00	121	242	1,0	121
0,55	251	0,92	132	232	1,10	121,5
0,60	261	0,83	143	222	1,20	122
0,70	277	0,71	166	207	1,40	124
0,80	289	0,62	188	196	1,60	125
0,90	302	0,55	211	182	1,80	127
1,00	312	0,50	234	172	2,00	129

* Le rapport T/A est exprimé en unités de flocculation. Concentration totale exprimée en microgrammes d'azote par millilitre (N toxine + N anticorps) dans chaque tube de diverses séries expérimentales.

Les calculs ont été faits pour les conditions expérimentales suivantes :

1^o Technique β (Ramon) : a) Volume total variable : toxine à 100 Lf/ml, 0,50 ml ; sérum à 100 Lf/ml, 0,1 à 1,0 ml ; b) Volume total constant : même répartition, le volume étant complété à 2 ml.

2^o Technique α (Dean et Webb) : a) Volume total variable : sérum à 100 Lf/ml, 0,50 ml ; toxine à 100 Lf/ml, 0,1 à 1,0 ml ; b) Volume total constant : même répartition, le volume étant complété à 2 ml.

3^o 100 Lf(T)/ml \rightarrow CT = 32,2 µg N/ml ; 100 Lf(A) 1451 \rightarrow CA₁ = 150 µg N/ml ; 100 Lf(A) 441 \rightarrow CA₂ = 452 µg N/ml.

Ces tableaux montrent aussi l'origine probable des divergences de résultats d'un laboratoire à l'autre. Il n'est pas rare de voir (et nous l'avons fait nous-mêmes) les résultats d'une détermination de titre flocculant rapportés avec la simple mention suivante : « le titre du sérum a été déterminé par flocculation selon la technique Ramon ».

La technique initiale de Ramon [70] est à volume total variable. Elle s'accompagne d'une variation faible de la concentration totale et l'optimum de flocculation qu'elle permet de déterminer est très voisin de l'optimum « vrai » dans le cas des sérum à β_2 -antitoxine.

La technique initiale décrite par Dean et Webb [47] est à volume total constant. Elle a été employée sous cette forme par Pillemér pour la détermination du titre flocculant du système toxine-antitoxine diphtériques [61].

TABLEAU VI. — Sérum 1451 (β_2 -antitoxine).

Volume ajouté Toxine(tech.alpha) ou Sérum(tech.beta)	Technique beta (Ramon)			Technique alpha(Dean & Webb)		
	Volume total variable	T/A*	Volume total constant	Volume total variable	T/A*	Volume total constant
0,1	51	5	15,5	130	0,20	39
0,2	65	2,5	23	116	0,50	40,7
0,3	76	1,66	30,5	105	0,60	42,3
0,4	84	1,25	38	97	0,80	43,9
0,45	88	1,11	41,7	94	0,90	44,7
0,50	91	1,00	45,5	91	1,00	45,5
0,55	93	0,92	49,3	88	1,10	46,3
0,60	96	0,83	53	85	1,20	47,1
0,70	101	0,71	60,5	81	1,40	48,7
0,80	104	0,62	68	77	1,60	50,3
0,90	108	0,55	75,5	74	1,80	52
1,00	110	0,50	83	71	2,00	53,5

(Même légende que tableau V.)

D'autre part, la concentration totale (A + T) augmente très faiblement lorsque T/A augmente dans une des variantes : technique α (volume constant) alors qu'elle diminue lorsque T/A augmente dans les trois autres variantes.

La technique Dean et Webb à volume constant est celle qui se rapproche le plus de la technique à concentration totale fixe. Ceci est dû à ce que la teneur en N de l'unité de flocculation d'antitoxine (1,50 à 6,00 µg N) est beaucoup plus élevée que celle de la toxine (0,322 µg N). Ainsi s'explique également le fait que pour certains systèmes, on n'observe de minimum net en fonction du rapport antigène/anticorps que par la technique α (à volume constant). Dans les autres techniques, pour ces sérum

particuliers, le minimum en fonction de T/A se trouve masqué par l'influence prédominante de la variation de concentration totale.

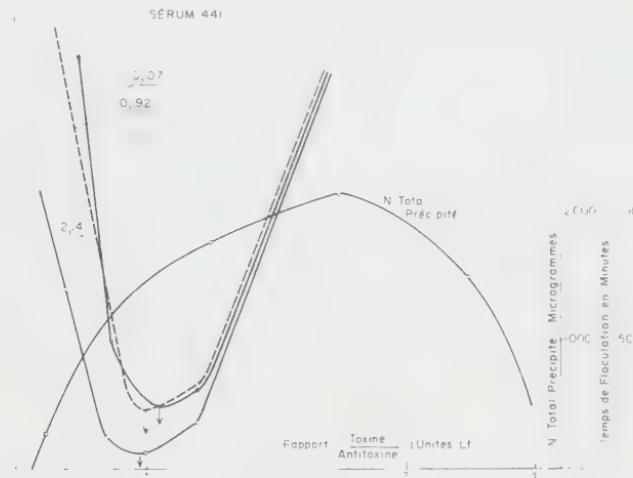


FIG. 3.

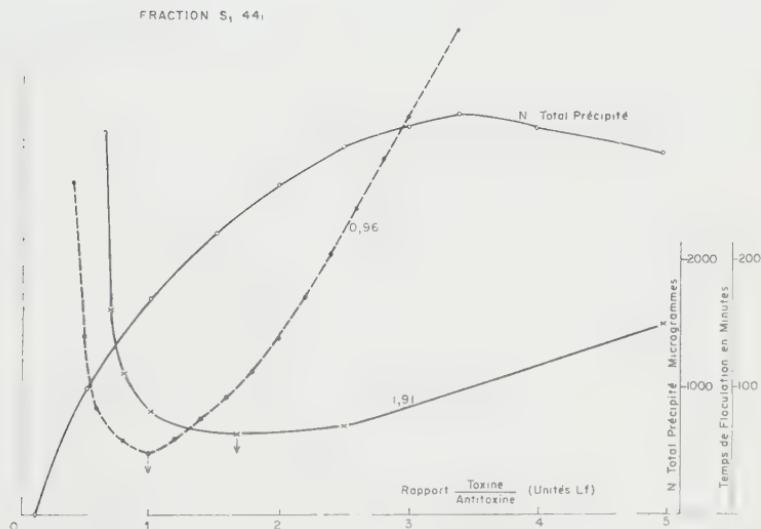


FIG. 4.

Dans la plupart des cas, la variation associée de la concentration totale n'a pas pour effet de supprimer le minimum en fonction de T/A, mais provoque un déplacement du minimum

vers des valeurs « apparentes » plus basses ou plus élevées, du rapport antigène/anticorps. La valeur ainsi observée correspond alors à une estimation erronée du titre floculant du sérum. Ce point est illustré par les figures 3 et 4.

L'amplitude des variations provoquée dans la valeur du rapport antigène/anticorps correspondant à la flocculation initiale par les variations associées de la concentration totale est très variable d'un sérum à l'autre. Elle est exprimée par la relation empirique [4] et dépend donc des valeurs de la constante b .

D'une façon générale, elle est plus faible pour les sérums à α_2 -antitoxine et plus élevée pour les sérums à γ -antitoxine.

Elle peut être négligeable, du même ordre de grandeur que les erreurs expérimentales sur l'ensemble des mesures de volume. C'est ce que l'on observe avec l'étalement international de flocculation qui fournit ainsi des chiffres présentant une bonne concordance pour une toxine donnée, quelle que soit la technique adoptée.

Elle peut être très importante (fraction S 1 de 441) amenant alors à une évaluation très erronée du titre floculant, qui paraît varier avec les conditions expérimentales de sa détermination.

Bowen et Wyman ont proposé [4] une méthode simple pour supprimer les variations parasites de la concentration totale. Elle conduit à une technique que nous proposons d'appeler technique γ [90]. Cette technique fournit des résultats identiques, que l'on utilise la disposition α ou la disposition β et permet de définir de façon univoque le titre floculant d'un sérum déterminé.

Elle consiste à employer des solutions de toxine et d'antitoxine de même concentration totale en azote précipitable.

Soit T la concentration de toxine en unités Lf par millilitre, CT la concentration correspondante en microgrammes d'azote de toxine par millilitre, A la concentration en antitoxine en unités de flocculation par millilitre, CA la concentration correspondante en microgrammes d'azote anticorps précipitable par millilitre.

On réalise des solutions telles que $CT = CA$.

A condition d'opérer à un volume total *variable*, la concentration totale en azote précipitable restera constante et égale à $CT = CA$, aussi bien dans la technique α que dans la technique β (4).

Si l'on prend une solution de toxine à 100 Lf par millilitre ($CT = 32,2$), la concentration en antitoxine (A_0) exprimée en unités Lf d'antitoxine, à utiliser, variera considérablement d'un sérum à l'autre, dépendant de la teneur en azote d'une unité de

(4) Si l'on mélange V_1 ml de toxine et V_2 ml d'antitoxine, la concentration totale en azote est en effet :

$$(V_1 \times CT + V_2 \times CA) / (V_1 + V_2) = (V_1 + V_2) \times CT / (V_1 + V_2) = CT = CA.$$

flocculation d'antitoxine (ym). On trouvera dans le tableau VII les valeurs de Ao calculées pour quelques sérums représentatifs.

On peut donc fixer la règle empirique suivante :

On détermine le titre flocculant apparent ou « titre provisoire » par la technique Ramon (volume variable) ou la technique Dean

TABLEAU VII.

Sérum	Ao [*]	ym ^{**}	Observations
Sérum 441 Fin	7,11	4,52	Gamma antitoxine prédominante
Sérum 1451 Fin	21,5	1,50	Beta-2-antitoxine prédominante
Sérum 906	23	1,40	Beta-prime antitoxine prédominante
Sérum 1451 bis	26,2	1,23	Beta-prime antitoxine purifiée (76 % d'N précipitable)
Mouton n° 4	6,90	4,67	Antitoxine gamma-prime-S (Sérum digéré)

* Ao : Concentration d'antitoxine exprimée en unités de flocculation d'antitoxine par millilitre et telle que $C_{Ao} = 32,2 \mu\text{g N/ml}$. ** ym : Quantité d'azote anticorps précipitable exprimée en microgrammes, correspondant à 1 unité de flocculation d'antitoxine.

et Webb (volume constant). On réalise ensuite une dilution du sérum telle que la concentration finale soit Ao Lf/ml en unités provisoires :

Sérum à γ -antitoxine	7 Lf/ml
Sérum de mouton	7 Lf/ml
Sérum à β -2 antitoxine	20 Lf/ml
Sérum digéré	25 Lf/ml

On titre ensuite le sérum par la technique α ou β avec une solution de toxine à 100 unités Lf/ml.

Pour des raisons de commodité de répartition des solutions, il est préférable d'utiliser cependant la technique α .

Voici une des modalités possibles :

On ajoute dans chaque tube un certain volume, toujours le même, de la dilution de sérum à Ao unités Lf/ml. On choisit cette quantité de façon à ce que l'on ait dans chaque tube un nombre d'unités Lf d'antitoxine compris entre 25 et 50. On ajoute ensuite des volumes croissants de la solution de toxine à 100 unités Lf/ml. Le volume total est ainsi variable d'un tube à l'autre.

Les dilutions seront faites de préférence en tampon $\text{PO}_4\text{KH}_2/\text{K}_2\text{H}$ 0,150 M, $\text{pH} = 6,8$ ou 7,6, ou en tampon $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,150 M.

pH = 8,2 additionné de NaCl, 0,172 M, et de peptone (1 p. 100) ou de gélatine (0,1 p. 100). On place ensuite les tubes au bain-marie à 45° et on recherche le tube présentant la flocculation initiale.

Pour certains sérums, lorsqu'on emploie une toxine pure (2 200 Lf/mg N), la flocculation initiale est très rapide (trente secondes à cinq minutes). On a alors intérêt à effectuer les répartitions avec des liquides maintenus à 0° + 4°. Lorsque toutes les répartitions ont été terminées et les tubes disposés sur un portoir maintenu à 0°, on plonge, au temps zéro, l'ensemble des tubes dans un bain-marie à 20° ou 30° seulement. On arrive alors à repérer aisément le premier tube qui flocule.

La valeur trouvée par cette technique ne dépend que du rapport antigène/anticorps (T/A) et fournit le titre flocculant réel du sérum, qui peut être différent du titre provisoire initial.

Cette technique (ou les multiples variantes possibles) permet donc de définir sans ambiguïté le titre flocculant du sérum.

On peut donc légitimement comparer les courbes de précipitation de divers sérums effectuées pour un même nombre d'unités flocculantes (ici 400 Lf A/5 ml) et calculer les courbes « réduites » ou certaines caractéristiques de ces courbes « réduites » correspondant à 1 unité Lf de sérum.

On se réfère ainsi à une propriété quantitative bien définie des sérums.

Nous verrons cependant en détail plus loin, et nous avons déjà indiqué plus haut que cette quantité, quoique bien définie, ne correspond pas à des quantités égales d'antitoxine dans tous les sérums.

C. Résultats de l'étude de la réaction de précipitation quantitative. — Ces résultats ayant déjà été publiés en détail [87, 92, 94, 95, 96, 98] nous en donnerons seulement ici un résumé synthétique sous la forme de conclusions.

1^o Seules les β_2 -antitoxines donnent la courbe dite de type cheval ou de type flocculation. Elles conservent cette propriété après digestion pepsique. Rappelons que la courbe de type flocculation présente les trois particularités suivantes :

- a) Le précipité spécifique est soluble dans un excès d'anticorps.
- b) Il existe une longue zone, d'allure plus ou moins rectiligne, dite zone d'équivalence. Les surnageants du précipité spécifique, tout au long de cette zone, ne contiennent ni toxine ni antitoxine décelable par précipitation spécifique *in vitro*.
- c) On ne trouve de toxine libre titrable *in vivo* ou *in vitro* en quantité appréciable dans le surnageant, qu'après le point de précipitation maximum (M) ; ce point correspond à un rapport

toxine/antitoxine ajoutées, exprimé en unités de flocculation, nettement supérieur à 1 (tableaux VIII, IX, X, XI).

Ces propriétés s'observent aussi bien dans le cas des sérum hyperimmuns très neutralisants (à Schick négatif) que des sérum de chevaux à faible pouvoir neutralisant (à Schick positif).

TABLEAU VIII. — Propriétés numériques des sérum à γ -antitoxine prédominante.

Sérum	$\alpha L+/Lf$	xm/xf	yf	ym	ym/yf	A/T(Lf)	A/T(M)
441 Début	1,37	1,68	3,02	3,18	1,05	4,19	2,63
441 Début	1,60	1,60	2,35	2,39	1,02	3,25	2,08
441 Début	2,90	2,78	3,25	4,40	1,31	4,63	2,77
441 Fin (a)	1,89	2,50	3,35	5,35	1,60	4,69	2,94
441 Fin (b)	1,89	2,50	3,31	4,52	1,36	4,64	2,53
441-1 n° 1	3,26	3,40	3,91	6,57	1,75	5,45	2,82
441-3 1 n° 2	~,50	2,50	3,22	4,50	1,33	4,53	2,40
441-3 1 n° 3	2,30	2,00	3,20	4,05	1,20	4,48	2,63
441 gamma ^a	1,06	1,16	1,63	1,66	1,02	4,05	3,14
pig 5 D	0,92	1,50	3,15	3,36	1,06	4,41	3,14
Mouton n° 4 digéré	3,44	2,50	3,18	4,67	1,47	7,10	4,17
Mouton n° 5 brut	3,75	2,50	3,61	5,09	1,41	5,09	3,61
Mouton n° 5 digéré	4,12	4,00	4,26	6,56	1,54	9,50	3,61

(a) Courbe établie avec une toxine à 2 800 Lf/mg N [92]; (b) Courbe établie avec une toxine à 3 200 Lf/mg N : xm/xf = rapport des abscisses des points M (maximum de précipitation) et Lf (point correspondant à la flocculation initiale); yf = N anticorps effectivement précipité au point Lf (pour une unité de flocculation de sérum); ym = N anticorps maximum précipitable par la toxine diphtérique purifiée contenu dans une unité de flocculation de sérum; A/T (Lf) = rapport moléculaire anticorps/toxine dans le précipité spécifique recueilli au point Lf (flocculation initiale); A/T (M) = rapport moléculaire anticorps/toxine dans le précipité spécifique recueilli au point M (maximum de précipitation).

Il en résulte immédiatement que les explications proposées par Cohn et Pappenheimer [16] pour rendre compte de la différence entre les diverses unités de toxine L+, Lr, Lo, ne peuvent être acceptées sans modification. Ces auteurs admettaient que la valeur supérieure à 1 du rapport L+/Lf ou Lr/Lf de la toxine diphtérique, reflétait les particularités de la courbe de précipitation, à savoir que la toxine libre n'apparaît qu'un peu après le maximum de précipitation, dans le cas des sérum de chevaux.

On pourrait évidemment admettre cette explication pour les sérum à β_2 -antitoxines de chevaux à Schick négatif, moyennant

TABLEAU IX. — Propriétés numériques des sérum à β_2 -antitoxine prédominante.

Sérum	$\alpha = L+/Lf$	xm/xf	yf	vm	vm/yf	A/T(Lf)	A/T(E)
Copenhague antitoxique	1,00	1,50	1,64	1,75	1,07	2,32	1,63
Copenhague flocculation	1,00	1,50	1,49	1,53	1,02	2,09	1,43
341 Fin	0,90	1,68	2,02	2,10	1,04	2,79	1,75
1451 Fin	0,89	1,25	1,50	1,50	1,00	2,09	2,09
1451 S2 n° 1 (NaCl 4%)	0,85	1,25	1,58	1,60	1,01	2,21	1,80
1451 (fraction* soluble 1,40 M)	0,85	1,25	1,55	1,55	1,00	2,17	1,73
441-S2	1,75	2,25	2,74	3,65	1,33	3,82	2,19

* Courbe en milieu salin concentré (même légende que tableau VIII).

quelques arrangements mineurs (5) avec les données expérimentales, parce que pour ces sérum le rapport $L+/Lf$ ou Lr/Lf est voisin de 1.

(5) La mesure expérimentale directe nous a montré que l'unité Lr de toxine diphthérique pure fraîchement préparée correspond à 1,10-1,15 unité Lf de toxine, la détermination étant faite avec le sérum étalon international lui-même.

Sur la courbe de précipitation quantitative du même sérum étalon international, la toxine libre n'apparaît que pour un rapport T/A , exprimé en unités de flocculation, égal à $550/400 = 1,37$.

Dans la conception de Cohn et Pappenheimer, on devrait trouver pour ce sérum, de la toxine libre dans le surnageant pour un rapport $T/A = 1,10$ à $1,15$, et par ailleurs, le maximum de précipitation devrait se produire à peu près pour la même valeur. Or, il se produit pour $T/A = 600/400 = 1,50$.

En fait, l'explication réelle est beaucoup plus simple. Il apparaît de la toxine non neutralisée dans le précipité spécifique pour un rapport $T/A = 450/400 = 1,10$.

On retrouve donc la même valeur pour le rapport Lr/Lf de la toxine pure, soit par détermination expérimentale directe à une concentration (1 UI/ml) qui ne s'accompagne pas de formation apparente de précipité, soit par l'établissement de la courbe de précipitation quantitative, mais à condition de rechercher le premier mélange non neutre dans les précipités spécifiques.

LA RÉACTION TOXINE-ANTITOXINE DIPHTÉRIQUES 655

TABLEAU X. — Propriétés numériques des sérum à β' -antitoxine (sérum digérés).

Sérum	$\alpha=L+/Lf$	xm/xf	yf	ym	ym/yf	$A/T(Lf)$	$A/T(M)$
5355 A	0,85	1,25	1,35	1,37	1,04	3,27	2,73
906 (NaCl φ)	0,88	1,50	1,35	1,40	1,03	3,36	2,33
906 (1,0 M)	0,88	1,50	1,88	2,00	1,06	4,66	3,32
1310	0,58	1,25	1,17	1,17	1,00	1,65	1,25
1451-beta ^a n° 1 (NaCl φ)	1,00	1,25	1,12	1,12	1,00	2,80	2,23
1451-beta ^a n° 1 (1,0 M)	1,00	1,50	1,20	1,23	1,03	2,99	2,04
1451-beta ^a n° 1 (1,40 M)	1,00	1,50	1,23	1,23	1,00	3,04	2,04
1451-beta ^a n° 2 (1,0 M)	0,80	1,50	1,43	1,43	1,00	3,54	2,37

(Même légende que tableau VIII.)

TABLEAU XI. — Propriétés numériques des sérum de chevaux à Schick positif.

Sérum	$\alpha=L+/Lf$	xm/xf	yf	ym	ym/yf	$A/T(Lf)$	$A/T(M)$
825-39°	0,32	1,25	1,69	1,70	1,00	2,37	1,90
825-39°-S1	0,56	1,50	2,83	3,27	1,15	3,95	3,06
825-39°-S2 (n° 1)	0,24	1,00	1,64	1,64	1,00	2,30	2,30
825-39°-S2 (n° 2)	0,23	1,25	1,52	1,59	1,04	2,10	2,00
854-25°	0,38	1,50	1,98	2,23	1,07	2,74	2,08
854-60°	0,87	1,50	2,32	2,37	1,02	3,26	2,18

(Même légende que tableau VIII.)

Mais pour les sérum de chevaux à Schick positif, cette explication ne cadre absolument pas.

Avec un rapport $L+/Lf = 0,32$, par exemple dans le cas du sérum 825-39° jour, le point $L+$ est en pleine zone d'excès d'anticorps précipitant.

Nous avons trouvé l'explication de ce phénomène en montrant que les anticorps neutralisants et les anticorps précipitants ne sont pas obligatoirement identiques, autrement dit que certains anticorps, quoique capables de précipiter spécifiquement la toxine, sont incapables de la neutraliser.

Lorsque le taux des anticorps précipitants non neutralisants est nettement supérieur à celui des anticorps neutralisants, les premiers mélanges toxiques (mélanges L+ ou Lr) se trouvent situés en pleine zone de précipitation (en excès d'autres anticorps) et ne peuvent être mis en évidence qu'à condition de rechercher la toxicité des précipités spécifiques [96].

Particulièrement net dans le cas des sérum des chevaux à Schick positif, ce phénomène s'observe aussi avec les sérum des animaux à Schick négatif.

Le premier mélange non neutralisé est un mélange insoluble pour les β_2 -antitoxines de chevaux à Schick négatif lorsqu'on opère à la concentration de 80 Lf A/ml, et la recherche de la toxicité des précipités spécifiques permet de retrouver rigoureusement, lors de l'établissement de la courbe de précipitation quantitative, les diverses valeurs du titre neutralisant, déterminées indépendamment par les techniques classiques.

Les sérum purifiés par digestion pepsique du sérum total ont un comportement analogue à ceci près que le taux d'azote précipitable, par unité Lf de sérum, y est très sensiblement réduit. Le rapport de l'azote anticorps précipitable à l'azote total reste cependant peu élevé (21 à 30 p. 100) pour les préparations obtenues par digestion du sérum total.

Par digestion du précipité spécifique, nous avons pu obtenir une préparation (1451- β') qui contenait 76 p. 100 d'azote précipitable. Des résultats analogues ont été obtenus par Northrop [54].

La solubilité du précipité spécifique en excès d'anticorps peut être supprimée dans le cas des sérum à β_2 -ou β' -antitoxine, en effectuant la précipitation spécifique en milieu salin concentré ($\text{PO}_4\text{KH}_2/\text{K}_2\text{H}$, 1,0 M ou 1,40 M), comme l'avait déjà noté Pope [65]. La courbe de précipitation présente alors un type mixte. Le précipité se forme même en excès d'anticorps, mais la courbe continue à présenter une longue zone d'équivalence. En milieu salin concentré, la zone d'équivalence est rectiligne et l'augmentation d'azote précipité le long de la droite correspond sensiblement à l'azote de la toxine ajoutée.

On retrouve donc en milieu salin concentré les résultats observés par Pappenheimer [56, 57] en milieu salin de concentration moyenne, avec certains sérum sélectionnés.

2° Les γ -antitoxines donnent une courbe de type précipitine, aussi bien chez les chevaux à Schick positif que chez les chevaux à Schick négatif.

La toxine libre *in vivo* apparaît dans le surnageant dès que le point L+ a été atteint ; ce point se trouve assez loin avant le maximum de précipitation pour les γ -antitoxines de chevaux

TABLEAU XII.

Sérum ou fractions	L+/Lf
441 Fin	1,89
441 Fraction S 1 n° 1	4,86
441 Fraction S 1 n° 2	2,50
441 Fraction S 1 n° 3	2,30
825-39°	0,32
825-39°-Fraction S 1	0,56
825-39°-Fraction S 2	0,24

S 1 : Fraction obtenue par relargage du sérum entre 0 et 0,33 de saturation en SO_4Am_2 . S 2 : Fraction obtenue par relargage du sérum entre 0,33 et 0,50 de saturation en SO_4Am_2 . Lorsque le sérum contient des γ - et des β_2 -antitoxines, la fraction S 1 est enrichie en γ -antitoxine, la fraction S 2 en β_2 -antitoxine. On peut éliminer les β_2 -antitoxines de la fraction S 1 ou réduire considérablement leur taux, en répétant plusieurs fois l'opération de relargage. C'est ce que nous avons effectué pour la fraction S 1 n° 1 du sérum 441. Par une seule précipitation entre 0 et 0,33 de saturation, on n'élimine pas toutes les β_2 -globulines. Les préparations S 1 n° 2 et S 1 n° 3 du sérum 441 sont de ce type, enrichies seulement en γ -antitoxine. Si le sérum est totalement dépourvu de gamma antitoxine, ce qui est le cas général des séums commerciaux, la fraction S 1 contient principalement des γ -globulines non anticorps : les seules antitoxines qu'elle contient sont des β_2 -antitoxines. Cette observation explique que Levine [46] n'a pas trouvé de différences entre les propriétés des « low-salt » et « hight-salt » fractions de ses séums qui ne devaient contenir que des β_2 -antitoxines, alors que Kekwick, opérant avec des séums qui contenaient certainement des γ -antitoxines, a été le premier à montrer que les fractions de type S 1 enrichies en γ -antitoxine avaient un rapport L+/Lf plus élevé que les fractions de type S 2, enrichies en β_2 -antitoxine. Ce même phénomène a été observé par Cinader [41, 42, 43] et par nous-mêmes [87, 95].

à Schick positif, au voisinage du maximum pour les séums de chevaux à Schick négatif.

Pour un sérum donné, les γ -antitoxines ont un rapport L+/Lf plus élevé que les β_2 -antitoxines du même sérum (tableau XII).

Lorsqu'on considère uniquement les séums hyperimmuns avides de chevaux à Schick négatif, l'observation de Kekwick [36, 37] et Cinader [41, 42, 43] se trouve donc vérifiée, à savoir : que le rapport L+/Lf des γ -antitoxines est supérieur à 1.

Mais la proposition n'est pas générale. Chez les chevaux à Schick positif, les γ -antitoxines, quoique plus neutralisantes que les β_2 -antitoxines du même sérum pour un même titre flocculant, ont un rapport L+/Lf nettement inférieur à 1.

On ne peut donc pas dire que les γ -antitoxines par elles-mêmes sont de meilleures antitoxines que les β_2 -antitoxines. Leur activité neutralisante et leur avidité peuvent être éventuellement plus faibles que celles des β_2 -antitoxines prélevées chez un autre animal, quoiqu'elles soient toujours plus élevées que celles des β_2 -antitoxines prélevées chez le même animal.

La qualité de l'antitoxine (c'est-à-dire son avidité et la non-réversibilité des complexes neutres qu'elle forme avec la toxine) dépend du mode d'immunisation et est nettement supérieure lorsque l'animal hyperimmunisé présentait une immunité antitoxique préalable et suffisamment ancienne.

Chez les chevaux à Schick négatif utilisés pour la préparation des sérum commercial, il convient cependant de noter, comme l'avait vu Kekwick [38], que dans la première phase de l'hyperimmunisation, l'antitoxine qui se trouve associée alors aux γ -globulines, est pourvue d'un pouvoir neutralisant plus élevé par unité Lf que les antitoxines β_2 -globulines obtenues dans une phase ultérieure.

Les titres absolus beaucoup plus élevés, obtenus dans cette deuxième phase, ont amené la plupart des Instituts producteurs de sérum à continuer l'immunisation jusqu'à ce stade.

Les sérum commercial sont donc uniquement des sérum à β_2 -antitoxines. Ils sont même le plus souvent soumis à la digestion pepsique. Les sérum digérés ainsi obtenus ne contiennent en général pas de γ -antitoxine (sauf chez le mouton).

On peut se demander s'il n'y aurait pas intérêt à réexaminer cette pratique et à préparer des sérum hyperimmuns de chevaux à Schick négatif riches en γ -antitoxine (6).

Avec des pouvoirs flocculants beaucoup plus faibles et des titres neutralisants absolus inférieurs, ces γ -antitoxines pourraient se révéler pourvues d'une activité thérapeutique plus élevée en raison de leur forte avidité. La question a été posée par Kekwick [38] qui a présenté certains arguments en faveur de cette hypothèse (*Cf.* aussi Mc Sweeney [49]).

Des essais sont en cours pour examiner ce point particulier. On peut d'ailleurs se demander si les meilleurs résultats obtenus

(6) L'hyperimmunisation par des anatoxines pures adsorbées et le contrôle régulier des saignées d'essai par l'immunoélectrophorèse permettent en effet d'obtenir assez facilement chez le cheval à Schick négatif des sérum riches en γ -antitoxine et de titre flocculant acceptable (200 à 300 unités Lf/ml).

avec les γ -antitoxines de cheval sont dus à la valeur plus élevée du rapport L+/Lf qu'elles présentent.

Les β_2 -antitoxines hyperimmunes sont aussi « avides » à notre avis que les γ -antitoxines prélevées chez le même animal.

Mais les γ -globulines sont « construites » sur un modèle très voisin dans toute la série animale. Les γ -antitoxines de mouton et de cheval ont des poids moléculaires voisins de celles de l'homme et des caractères de solubilité analogues, alors que les β_2 -globulines de cheval ont des propriétés nettement distinctes (*Cf.* en particulier les propriétés de relargage).

Il est dès lors possible que les γ -antitoxines (de mouton ou de cheval), par leur analogie plus grande avec les anticorps γ -globuliniques humains normaux, aient un accès plus facile aux cellules des différents tissus et pénètrent plus aisément, soit jusqu'au foyer primaire qui libère la toxine, soit jusqu'aux groupes cellulaires particulièrement menacés par la diffusion de cette dernière.

3^e Position du point Lf. — La flocculation initiale se produit pour une certaine valeur du rapport toxine/antitoxine qui correspond par définition à 1 lorsque les concentrations des deux substances sont exprimées en unités de flocculation. Le point correspondant sur la courbe de précipitation occupe une position très variable par rapport au maximum d'azote total précipité.

Il est très loin du maximum dans le cas des γ -antitoxines de cheval et de mouton, sensiblement plus rapproché du maximum dans le cas des sérums de lapin.

Si l'on construit les courbes réduites (azote total précipité et azote anticorps précipité) correspondant à 1 unité de flocculation d'antitoxine, l'abscisse du point Lf est égale à 1 et l'abscisse du maximum (xm) permet une mesure simple de l'écart entre le point Lf et le point M.

Pour les valeurs du rapport antigène/anticorps (T/A) exprimées en unités de flocculation et comprises entre 1 et xm, on se trouve presque toujours dans la zone d'équivalence classique. On ne trouve ni anticorps ni antigène détectables par précipitation spécifique en gel. Cependant, dans le cas des γ -antitoxines de chevaux à Schick négatif, ou de mouton, on trouve dans toute cette région, jusqu'au point L+, un excès d'antitoxine titrable *in vivo* dans les surnageants. Le segment de la courbe de précipitation correspondant à la zone d'équivalence a une forme qui dépend de la nature électrophorétique de l'antitoxine : arrondie dans le cas des γ -antitoxines, plus ou moins rectiligne dans le cas des β_2 -antitoxines.

L'augmentation de l'azote anticorps précipitable entre les point Lf et M, observable dans le cas des γ -antitoxines, correspond donc à la présence dans le sérum d'anticorps particuliers :

ils ne sont pas décelables par précipitation spécifique directe ; ils sont décelables par leur pouvoir neutralisant *in vivo* et peuvent coprécipiter en présence des anticorps éliminés au point Lf.

Le taux de ces anticorps détectables par titrage *in vivo* des surnageants est beaucoup plus élevé dans le cas des sérum à γ -antitoxine que dans le cas des sérum à β_2 -antitoxine.

Il en résulte que le taux d'azote anticorps total précipitable par unité de flocculation (ym) est toujours supérieur au taux d'azote anticorps précipité dans le mélange Lf (yf). L'écart reflété par le rapport ym/yf est faible pour les β_2 -antitoxines, mais très élevé pour les sérum à γ -antitoxine (*Cf.* tableaux VIII, IX, X, XI).

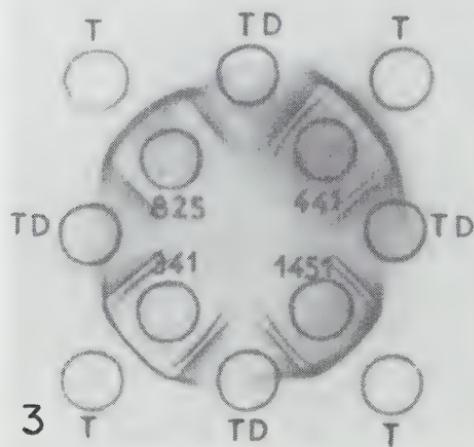
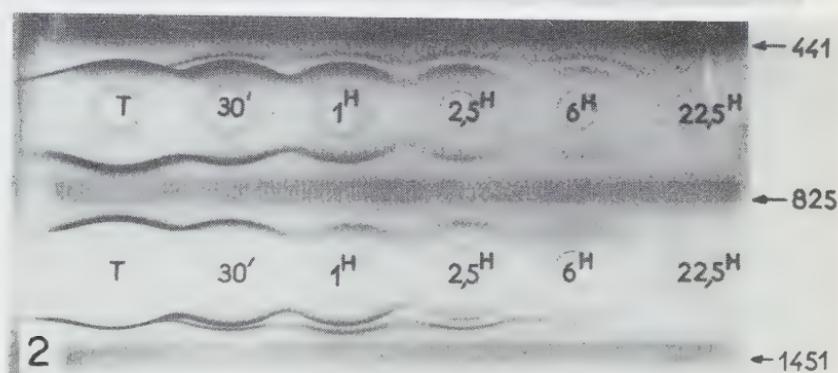
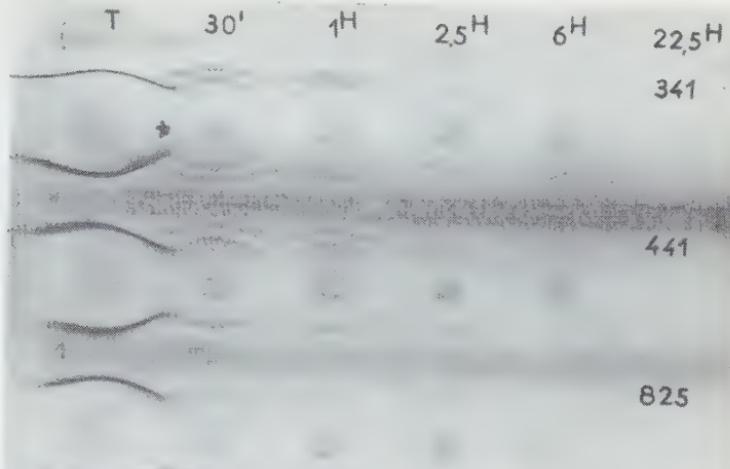
D. Conclusions de l'étude des courbes de précipitation quantitative. — Certains anticorps capables de réagir avec la toxine diphtérique en donnant un précipité sont dépourvus de pouvoir neutralisant. Ce phénomène est à rapprocher de ce que l'on observe avec certains systèmes enzymes-antienzymes.

L'interprétation la plus simple consiste à admettre l'hétérogénéité et la multiplicité des sites antigéniques sur la molécule de toxine diphtérique. C'est la conception que nous développerons plus loin. Elle est en accord avec les résultats obtenus par Lapresle [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45] pour le système albumine-albumine.

Pope [64, 66, 68] a présenté une interprétation toute différente. Pour cet auteur, la toxine diphtérique, même lorsqu'elle a été purifiée jusqu'au titre de 3 000-3 200 Lf/mg N, n'est pas une protéine pure, mais contient encore de multiples antigènes accessoires qu'il appelle dans ce cas « antigènes d'enveloppe ». Ces antigènes d'enveloppe ne peuvent être séparés de la toxine par les techniques ordinaires de fractionnement (relargage, chromatographie, électrophorèse, etc.), mais peuvent être mis en évidence aisément après traitement de la toxine à pH élevé (pH = 11) ou après digestion protéasique, comme nous le verrons plus loin.

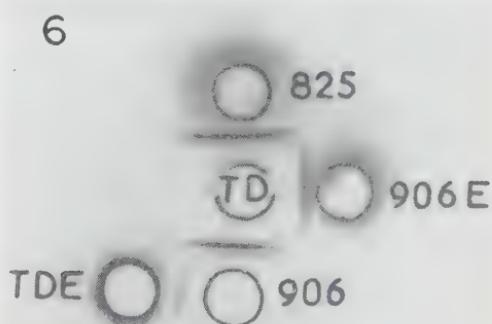
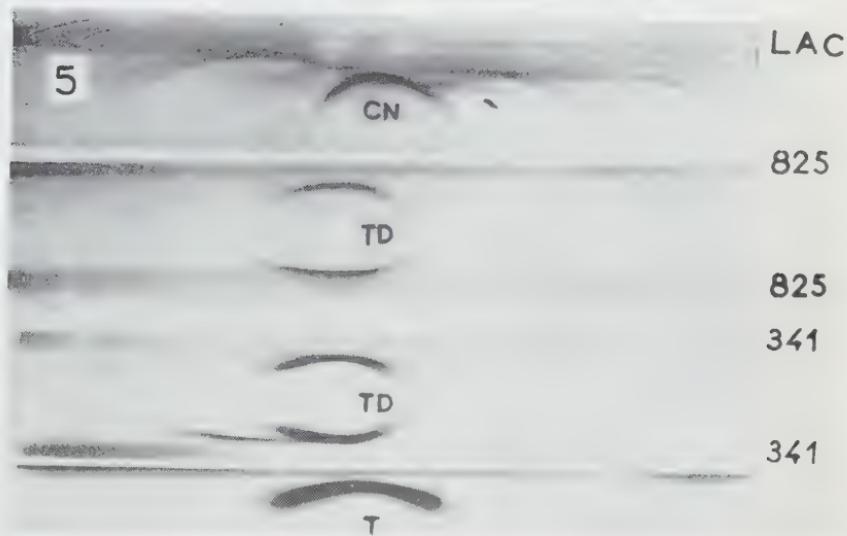
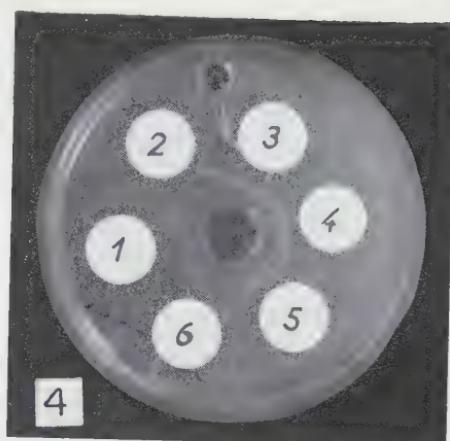
Les principaux arguments qui nous paraissent devoir être invoqués contre cette interprétation sont les suivants :

1^o La toxicité des précipités spécifiques que nous avons observée, après le point L+ et qui est particulièrement nette dans le cas des sérum de chevaux à Schick positif, s'explique difficilement dans cette théorie, à moins d'admettre que la toxine est entraînée de façon non spécifique dans le précipité spécifique formé entre les antigènes d'enveloppe et les anticorps homologues. Cet entraînement non spécifique est contraire aux observations habituelles en immunologie. Mais on pourrait à la rigueur admettre que la toxine diphtérique présente en cette matière un comporte-



LÉGENDE LA PLANCHE II

FIG. 4. — Au centre, sérum ER : 500 Lf/ml ; 1, toxine intacte : 600 Lf/ml ; 2, toxine digérée par la trypsine : 480 Lf T. D./ml ; 3, versenate de Na, pH = 11,5 : une heure ; 4, versenate de Na, pH = 11,5 : deux heures ; 5, versenate de Na, pH = 11,5 : trois heures ; 6, pepsine : quarante-huit heures.



ment particulier. Des expériences directes utilisant une toxine diphtérique marquée au ^{35}S ont été faites par Pappenheimer et Yoneda [58] pour essayer de mettre en évidence cet entraînement non spécifique, lors de la formation d'un précipité spécifique réalisé avec un système non apparenté.

Leurs résultats sont restés négatifs. Nous-mêmes, utilisant une toxine marquée à l' ^{131}I , nous n'avons pu mettre en évidence l'entraînement de la toxine marquée par un autre système.

2° Il est impossible de séparer par des voies physico-chimiques simples les antigènes d'enveloppe de la toxine proprement dite. De plus, même en faisant varier considérablement le rapport toxine/sérum, la technique d'Ouchterlony ne permet pas de mettre en évidence les composants multiples de ce système, lorsqu'on emploie la toxine intacte, sauf dans le cas de certains sérum et suivant des modalités très particulières sur lesquelles nous reviendrons dans une publication ultérieure.

Par contre, après digestion protéolytique ou après traitement alcalin, il est très facile d'observer un système de lignes multiples, chacune d'entre elles donnant une réaction d'identité avec le système sérum-toxine intacte.

En fait, il y a peu de différences de comportement entre les antigènes d'enveloppe tels que les conçoit Pope et les sites antigéniques distincts tels que nous les imaginons, alors que la signification théorique de chacune de ces deux représentations est très différente. Ces divergences théoriques conduisent surtout à des plans expérimentaux très différents pour la poursuite des expériences.

Si, comme le pense Pope, les réactions observées après digestion de la toxine sont dues à la présence d'antigènes d'enveloppe accessoires dans la préparation de toxine intacte, toutes les données obtenues aussi bien par la flocculation que par l'étude des courbes de précipitation quantitative sont sans signification aucune pour l'étude de la réaction entre la toxine et l'antitoxine neutralisante. Les systèmes dont on a examiné le comportement jusqu'ici n'ont en effet aucune parenté réelle avec la toxine, et sont analogues aux systèmes accessoires qui ont été éliminés en purifiant la toxine jusqu'au stade 3 000-3 200 Lf/mg N. La première et la plus urgente des tâches pour élucider ce problème resterait donc l'obtention de la toxine sous une forme plus pure.

Nous pensons personnellement que les préparations réalisées par Pope, par nous-mêmes et par d'autres auteurs, présentent une très haute pureté. Parmi les préparations de protéine qui ont été obtenues dans d'autres domaines (enzymes, hormones), il en existe à notre avis bien peu qui satisfassent aux mêmes critères de pureté. Ceci n'empêche pas que ces préparations puissent

contenir encore une certaine proportion d'impuretés constituées par des traces d'autres protéines. Mais nous pensons que ces impuretés (tout au moins celles qui seraient immunogènes et capables en donnant des anticorps chez l'animal d'intervenir effectivement comme antigènes accessoires avec le système toxine-antitoxine) ne représentent au maximum que 5 p. 100 des préparations étudiées.

La deuxième conception, celle des sites antigéniques multiples et qualitativement distincts, amène à de tout autres projets de recherches. Partant des considérations exprimées au dernier alinéa du paragraphe précédent, elle nous conduit à considérer que la toxine diphtérique peut être obtenue sous une forme raisonnablement pure du point de vue immunologique, et que les traces d'antigènes accessoires qu'elle contient peuvent être négligées. L'essentiel n'est plus de chercher à éliminer ces dernières traces, mais d'étudier en détail la structure de cette protéine telle qu'on peut l'obtenir et de chercher à la décomposer en fragments qui ne soient plus porteurs que d'un seul type qualitatif de sites antigéniques.

D'autre part, cette conception a l'avantage de se raccorder à une interprétation générale de la réaction protéine-antiprotéine et aux données nouvelles apportées par Lapresle [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45] dans ce domaine.

Nous verrons par ailleurs que cette hypothèse rend compte sans difficulté de l'effet Danysz et de son amplitude maxima, et qu'elle permet d'expliquer comment les anticorps neutralisants peuvent éventuellement avoir l'apparence d'anticorps non précipitants.

C'est à l'exposé des arguments expérimentaux qui militent en faveur de cette hypothèse que nous consacrerons la quatrième et dernière partie de cet exposé.

IV. DÉMONSTRATION DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES ANTICORPS ANTI-DIPHTÉRIQUES. — Le principe des expériences réalisées a été présenté dans le même numéro, par Lapresle [45]. Il consiste à faire diffuser contre un sérum antidiphétique donné, à partir de deux centres de diffusion, par la technique Ouchterlony [55], d'une part la toxine pure, d'autre part le produit de la digestion protéolytique ménagée de cette même toxine.

Le système sérum-toxine donne une seule ligne, le système sérum-toxine digérée plusieurs lignes distinctes, chacune d'elles entrant en coalescence avec la ligne toxine-sérum (réaction d'identité).

Nous avons d'abord utilisé le système protéasique complexe de Lapresle (extrait de rate à pH = 4,0, la digestion étant arrêtée par ajustement du pH à 7,0). Nous avons trouvé qu'il est difficile d'obtenir des extraits de rate d'activité constante et de conser-

vation longue. On est donc amené à redéterminer pour chaque nouvel extrait de rate les conditions optima de digestion permettant d'obtenir une fragmentation toujours la même de la toxine.

Ces expériences préliminaires ont l'inconvénient de consommer de la toxine pure dont la préparation est laborieuse.

C'est pourquoi nous avons très vite préféré la technique décrite par Pope [66] et qui repose sur l'emploi de la trypsine dont on arrête à temps choisi l'activité par addition de l'inhibiteur spécifique [préparé à partir du blanc d'oeuf dans nos expériences] (7).

Nous avons déterminé d'abord les conditions optima de digestion protéasique permettant d'obtenir une « toxine digérée » donnant plusieurs lignes avec divers sérums-types (sérums 1451, 441).

Nous avons utilisé de la trypsine cristallisée commerciale, marque Bios [activité : $0,833 \cdot 10^{-3}$ (T. U.)/mg] en quantité égale à 0,1 µg et 0,5 µg par unité Lf de toxine pure.

La digestion est faite en tampon phosphate 0,150 M de pH = 7,61, additionné de NaCl 0,172 M à 37°. La concentration en toxine a varié de 360 à 1 000 unités Lf/ml.

L'inhibiteur de la trypsine préparé selon Linneweaver et Murray [47] est ajouté après des temps variables (quantité : 2 µg pour 1 µg de trypsine).

La figure 1, pl. I, correspond à la digestion effectuée avec 0,5 µg de trypsine par unité Lf, la figure 2, pl. I, avec 0,1 µg de trypsine par unité Lf de toxine.

On peut voir qu'avec 0,5 µg de trypsine par unité Lf, on observe deux lignes nettes après trente minutes ou une heure de digestion : après deux heures trente de digestion, les fragments obtenus ne donnent plus qu'une très faible réaction.

(7) Dans le cas de la sérumalbumine, Lapresle a montré que la trypsine ne réalise pas un clivage de la molécule favorable à la formation de fragments de spécificité immunologique distincte. Pour la toxine diphtérique par contre, la trypsine donne de bons résultats. Il est bien évident qu'il faut chercher empiriquement pour chaque protéine, le mode de dégradation protéolytique ménagée à utiliser. La technique d'Ouchterlony et celle d'immunoélectrophorèse appliquées aux produits de dégradation partielle, avec révélation par divers sérums convenables, permet alors de choisir les conditions de dégradation les plus favorables à la séparation souhaitée de fragments à spécificité immunologique distincte. On dispose de nombreuses variables pour cette opération :

- a) Nature de la protéase.
- b) Choix d'un pH assez éloigné du pH optimum.
- c) Température.
- d) Durée d'action.
- e) Rapport enzyme-substrat.

Avec 0,1 µg de trypsine par unité Lf, il faut prolonger la digestion pour faire disparaître les fragments précipitants.

Le pouvoir floculant de la toxine digérée peut être mesuré par la technique de Ramon, en utilisant un sérum de titre connu. On recherche le mélange présentant la flocculation initiale et l'on admet que la quantité d'antigène présent dans ce mélange correspond au nombre d'unités de flocculation de sérum ajouté.

Les unités de flocculation de toxine digérée ainsi définies sont des unités arbitraires dont la signification n'est pas nettement établie, puisque les sérums ont été étalonnés avec un antigène qui n'est pas la toxine digérée mais la toxine intacte. Ces unités sont cependant commodes, car elles permettent de comparer les toxines digérées entre elles et avec la toxine intacte.

On constate que le titre floculant de la toxine digérée est toujours inférieur à celui de la toxine intacte et qu'il baisse pour tomber à zéro lorsque la digestion est suffisamment prolongée.

Dans les conditions de digestion que nous avons finalement retenues (0,1 µg de trypsine par unité Lf, 37°, une heure), le titre floculant résiduel est en moyenne de 30 p. 100 du titre originel.

La toxicité disparaît beaucoup plus rapidement que le pouvoir floculant au cours de la digestion trypsique.

Tous les sérums hyperimmuns obtenus chez des chevaux à Schick négatif donnent deux lignes nettes avec la toxine digérée (exemples : sérums 341, 441, 1451, mouton n° 5).

Il en est de même des sérums commerciaux complexes bruts ou digérés par la pepsine (exemple : sérum 906).

Aux concentrations relatives d'antigène (toxine digérée) et d'anticorps utilisées, voisines de celles de la flocculation initiale, les sérums obtenus par immunisation de chevaux à Schick positif de faible rapport L+/Lf ne donnent qu'une seule ligne de précipitation avec la toxine digérée (exemple : sérum 825, 39°).

Ces sérums permettent donc d'identifier dans la toxine digérée un fragment portant un certain type de motif antigénique (ou de motifs antigéniques) que nous désignerons par t_1 , les anticorps correspondants étant désignés par a_1 (fig. 3, pl. I).

Le deuxième motif antigénique (ou groupe de motifs antigéniques) observable grâce aux sérums hyperimmuns de chevaux à Schick négatif est désigné par t_2 , les anticorps correspondants par a_2 .

Les anticorps a_2 ne sont pas complètement absents des sérums type 825. Ils sont simplement à concentration trop faible pour être décelés lorsque les concentrations de toxine digérée et celles de sérum sont telles que le premier système a_1-t_1 est au voisinage de l'équivalence et que la quantité de précipité est suffisante pour que l'on obtienne une ligne nette. Si l'on emploie des concentrations plus élevées de toxine digérée et de sérum 825, on voit

apparaître la ligne correspondant au système a_2-t_2 (identifiée par comparaison avec les sérum hyperimmuns de chevaux à Schick négatif).

En utilisant de très fortes concentrations de toxine digérée et de sérum, on peut mettre en évidence un troisième système a_3-t_3 , distinct des deux précédents, les anticorps a_3 n'étant présents que dans certains sérum hyperimmuns (sérum 906, sérum de mouton).

La ligne correspondant à ce troisième système lorsqu'il est présent dans un sérum est toujours peu intense, visible à l'œil nu, mais difficile à photographier, quand on utilise comme antigène la toxine digérée par la trypsine.

Deux autres techniques de dissociation de la toxine ont été proposées par Pope, la digestion pepsique et le traitement alcalin [67].

La digestion pepsique ménagée fait apparaître deux « systèmes réagissants » distincts. La ligne la plus intense observable avec la toxine digérée par la pepsine correspond à la ligne la moins intense mise en évidence grâce à la toxine digérée par la trypsine.

La toxine maintenue à pH = 11 pendant trois heures à 35° donne deux lignes très nettes avec les sérum hyperimmuns avides. Les deux systèmes réagissants ainsi révélés donnent une réaction d'identité avec les deux systèmes obtenus par la digestion trypsique (fig. 4, pl. II).

On peut aussi reconnaître l'individualité des fragments obtenus par digestion trypsique de la toxine diphtérique, en utilisant, comme l'a fait Lapresle [40], la technique immunoélectrophorétique.

En appliquant cette dernière à une solution de toxine digérée et en assurant le développement par divers sérum antidiphtériques, on peut voir (fig. 5, pl. II) qu'aux concentrations utilisées, le sérum 825 ne réagit qu'avec un seul des fragments obtenus.

Le fragment t_1 est le moins mobile des deux. Il présente à pH = 8,2 une mobilité un peu plus élevée que celle de la toxine intacte. Cette dernière a, dans les conditions de l'expérience, une mobilité voisine de celle des α -globulines de cheval.

Les autres sérum hyperimmuns avides — représentés ici par le sérum n° 341 — donnent en plus de la ligne précédente, une deuxième ligne (t_2a_2). Le fragment t_2 est vraisemblablement constitué par un groupe de substances de mobilité variable, mais toujours supérieure à celle de la toxine intacte et voisine de celle de la sérumalbumine de cheval.

Les fragments t_1 et t_2 ont donc des différences de mobilité très importantes que nous pensons pouvoir utiliser pour leur séparation.

Le fait que le sérum 825 et, d'une façon générale, les sérum non avides de faible rapport L_+/Lf présentent une seule ligne bien visible, lorsqu'ils réagissent avec la toxine digérée, le rapport des concentrations antigène (toxine digérée)/sérum étant voisin de celui correspondant à la flocculation initiale, suggérait l'hypothèse que le deuxième système a_2-t_2 correspondait au système neutralisant. D'autant plus que les sérum de type 825 ne sont pas entièrement dépourvus d'anticorps a_2 , mais en contiennent seulement beaucoup moins que les sérum de chevaux à Schick négatif.

Diverses expériences d'épuisement ont alors été effectuées pour vérifier cette hypothèse. En voici le principe :

La toxine digérée par la trypsine dans les conditions indiquées (0,1 µg de trypsine par unité Lf, 37°, une heure) a perdu presque totalement ses propriétés toxiques (tableau XIII).

TABLEAU XIII.

	Li/ml	Kf	DMR.10 ⁶ /ml	POUVOIR FLOCCULANT RÉSIDUEL	TOXICITÉ RÉSIDUELLE	DMR/Lf
Toxine non digérée :	400	— mn	70,8	100 %	100 %	177 000
Toxine digérée :	150	25 mn	1,3	37,5 %	1,83 %	8 600

Nous avons fait réagir cette toxine digérée avec le sérum 906 (titre, 1 700 Lf/ml et 1 500 U. I./ml, $L_+/Lf = 0,88$) dans les conditions suivantes : sérum, 0,44 ml (748 unités Lf) + toxine digérée, 2,5 ml (750 Lf T. D.).

On place à 45° jusqu'à apparition de la flocculation. Le précipité formé est éliminé par centrifugation. On constate que le liquide surnageant ne contient plus d'anticorps neutralisants (titre inférieur à 5 U. I./ml).

La toxine digérée qui ne contient plus par unité Lf que 4,85 p. 100 de l'activité toxique initiale conserve le pouvoir d'éliminer totalement les anticorps neutralisants, une unité Lf de toxine digérée éliminant sensiblement une unité internationale d'antitoxine (pour un sérum de rapport $L_+/Lf = 0,88$).

Le surnageant obtenu lors de cette opération, débarrassé de ses anticorps neutralisants, entraînés dans le précipité formé par la toxine digérée, ne donne plus de précipité ni avec la toxine intacte, ni avec la toxine digérée.

Le sérum 906 contient donc les anticorps a_1 et a_2 en proportion telle que l'adjonction de toxine digérée élimine simultanément ces deux anticorps et le pouvoir neutralisant.

Une deuxième expérience réalisée avec le sérum 825 montre que les anticorps a_1 ne sont pas les anticorps neutralisants.

Une préparation de toxine digérée que nous supposerons contenir des fragments de spécificité distincte, t , t_1 , t_2 , etc., est précipitée dans les proportions correspondant à la flocculation initiale, par du serum 825. Le liquide surnageant désigné par T. D. E. ne contient plus de fragments t_1 : il ne réagit plus avec le serum 825 et ne donne plus qu'une seule ligne avec le serum 906 (fig. 6, pl. II). On peut donc écrire :

$$\text{T. D. E.} = t + t_2$$

La préparation T. D. E. donne encore une réaction en gel avec le serum 906, réaction correspondant au système a_2-t_2 . En milieu liquide, elle donne avec le serum 906 un précipité très fin.

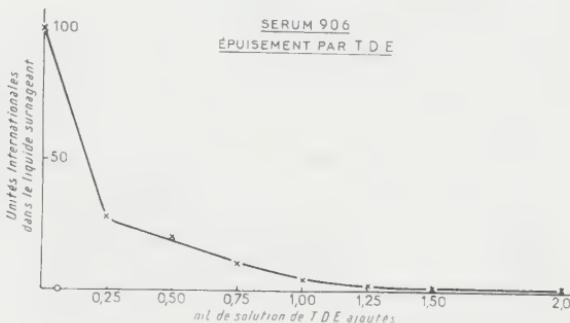


FIG. 5.

Si l'on ajoute des quantités progressivement croissantes de cette préparation antigénique T. D. E. ($= t + t_2$) et qu'on étudie les liquides surnageants obtenus après élimination du précipité formé, on constate que pour une certaine proportion de cet antigène ajouté, le surnageant est épuisé en anticorps a_2 et donne toujours la ligne a_1 .

Lorsque les anticorps a_2 sont ainsi complètement éliminés, les anticorps neutralisants sont aussi éliminés (fig. 5).

On voit que l'on peut éliminer les anticorps neutralisants par précipitation ou coprécipitation avec le système a_2-t_2 . La forme de la courbe (fig. 5) est intéressante à examiner. Les premières additions de T. D. E. éliminent une très forte proportion d'anticorps neutralisants. Pour réaliser l'élimination totale, il faut employer une quantité relativement élevée de T. D. E.

Après cette opération, on obtient une préparation : 906-E qui continue à donner avec la toxine digérée la ligne correspondant au système a_1-t_1 (fig. 6, pl. II).

Tous ces faits concordent à établir que les anticorps a_1 sont distincts des anticorps neutralisants.

On peut, à partir de cette donnée expérimentale, faire diverses hypothèses en ce qui concerne la nature des anticorps neutralisants.

1^o Les anticorps neutralisants a sont identiques aux anticorps a_2 .

2^o Les anticorps a_2 sont des anticorps précipitants non neutralisants, analogues aux anticorps a_1 , mais dirigés contre un autre motif antigénique t_2 distinct des motifs t_1 et t . Les anticorps a sont coprécipités avec le système a_2-t_2 .

3^o Il existe deux types différents d'anticorps neutralisants, a_2 et a .

Il est difficile pour l'instant d'apporter une preuve décisive en faveur de l'une de ces trois hypothèses.

Nous voudrions seulement présenter ici un certain nombre

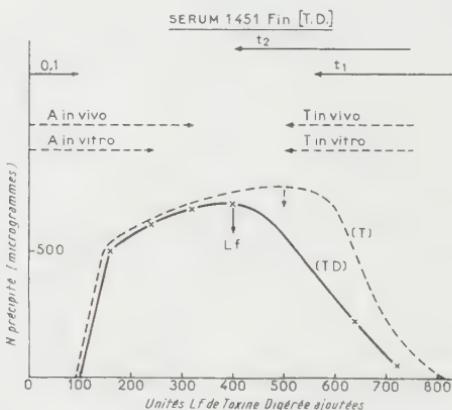


FIG. 6. — *Erratum*: En ordonnées, au lieu de 0,1 lire a_1 .

d'arguments, à vrai dire indirects, en faveur de l'existence d'anticorps a , spécifiquement neutralisants, et incapables de donner directement une réaction de précipitation, soit avec la toxine intacte, soit avec la toxine digérée.

La nature neutralisante ou non neutralisante des anticorps a_2 ne pourra être établie que par des expériences ultérieures.

Etude de la réaction de précipitation quantitative entre la toxine digérée et divers sérums antidiphériques.

Nous avons, après digestion standard, déterminé le titre flocculant (unités LF T. D.) de nos préparations et établi les courbes de précipitation quantitative, avec des quantités d'antitoxine égales à 400 LF A. Le volume total était de 5 ml et les conditions générales analogues à celles employées pour l'établissement des courbes avec

la toxine intacte. Quatre sérum ont été étudiés : 825-39°, 441 fin-43°, 1451 fin-82°, 906.

Nous avons cherché dans les surnageants les anticorps en excès capables de réagir par précipitation spécifique en gel avec la toxine intacte et la toxine digérée ainsi que les antigènes en excès. Ces derniers ont été détectés :

1^o De façon classique, par emploi du sérum homologue (sérum étudié) ;

2^o Par emploi d'un sérum hétérologue.

Le sérum 825, grâce à sa teneur élevée en anticorps a_1 , permet

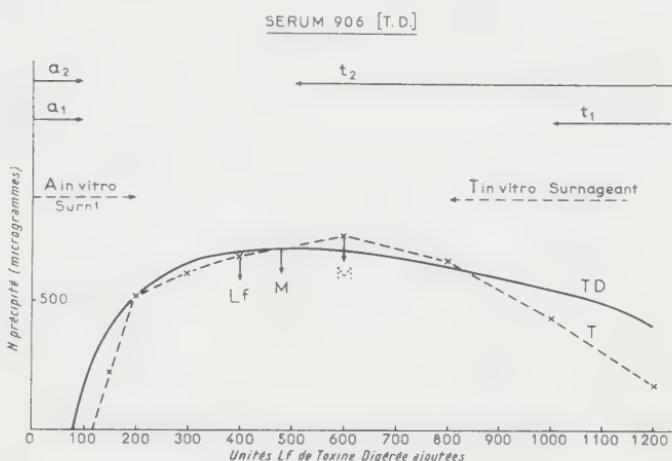


FIG. 7.

de rechercher les antigènes t_1 dans les surnageants obtenus avec les sérum 441, 1451, 906.

Le sérum 906, riche en anticorps a_2 , permet inversement la recherche des antigènes t_2 dans les surnageants obtenus avec le sérum 825.

L'examen des figures 6 et 7 montre que pour les sérum 1451 et 906, les courbes obtenues avec la toxine digérée et avec la toxine intacte ont des formes analogues avec le système d'unités employé en abscisses (unités Lf de toxine digérée pour la toxine digérée, unités Lf de toxine intacte pour la toxine intacte).

On remarquera cependant un certain nombre de différences intéressantes.

Dans le cas de la toxine digérée, il est évident que la courbe résulte de la superposition de deux systèmes précipitants qui ont chacun une zone d'équivalence distincte.

Cette zone débute à peu près au même point (correspondant à un rapport TD/sérum = 0,25). Mais la fin de cette zone, marquée par l'apparition dans les surnageants d'un excès d'un des antigènes, occupe une position différente pour les deux systèmes.

L'excès d'anticorps t_2 apparaît beaucoup plus tôt que l'excès d'anticorps t_1 .

L'écart entre les deux points d'équivalence est beaucoup plus important dans le cas du sérum 906 constitué par un mélange de sérum digérés que dans celui du sérum 1451.

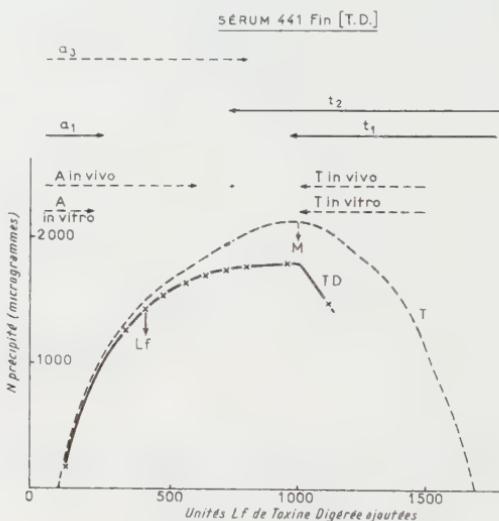


FIG. 8.

Pour les sérum 825 et 441 (fig. 8 et 9), les courbes de précipitation avec la toxine digérée sont nettement plus basses que les courbes avec la toxine intacte. On note aussi l'existence de plusieurs points d'équivalence.

Le taux d'anticorps a_2 est élevé, quoique inférieur à celui des anticorps a_1 pour le sérum 441.

Le sérum 825 est de tous les sérum étudiés le plus pauvre en anticorps a_2 .

Le calcul de l'azote anticorps est compliqué par les résultats que nous venons d'exposer. La détermination exacte de la teneur de nos différents sérum antidiptériques en anticorps a , a_1 , a_2 , ne sera en effet possible que lorsque nous disposerons de préparations ne contenant chacune qu'un seul type de fragments t , t_1 ou t_2 .

Notons dès à présent que l'hétérogénéité certaine des sérum antidiptériques enlève beaucoup de signification aux déterminations que nous avons faites du taux d'azote total précipitable correspondant à une unité Lf d'antitoxine. Les valeurs ym obtenues expérimentalement correspondent en effet à trois systèmes d'anticorps : a , a_1 , a_2 au moins.

De plus, l'un d'entre eux (anticorps a_1) joue un rôle prépondérant dans la réaction de précipitation, puisque tous les sérum paraissent en contenir un taux plus élevé. Or, ces anticorps a , sont apparemment dépourvus de pouvoir neutralisant.

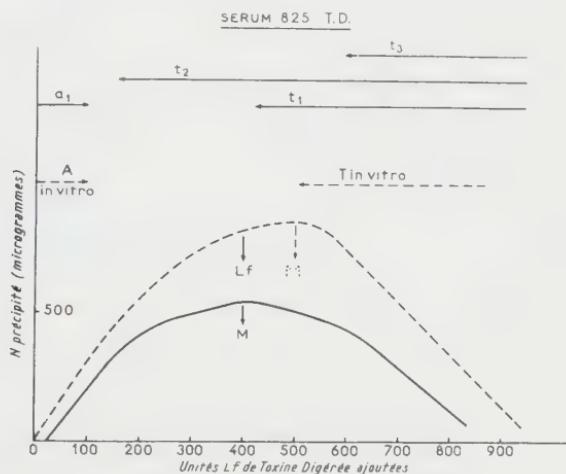


FIG. 9.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nous essayerons, pour finir, de réunir toutes les observations que nous avons faites en les regroupant autour d'une théorie simple et générale, que l'on peut présenter sous la forme suivante :

La toxine diptérique, comme la plupart des protéines, contient plusieurs sites antigéniques distincts que nous proposons de désigner par t_1 , t_2 , t , etc. Il existe au moins trois types qualitativement distincts de ces sites sur une molécule de toxine diptérique. Le site t est étroitement associé au groupement particulier qui est aussi responsable de la toxicité. Il paraît probable que le site antigénique t n'est pas le groupement toxique lui-même, puisque la toxicité peut être éliminée, en particulier après action du formol, sans que la disposition caractéristique du groupe t soit changée de façon appréciable.

En fait, dans l'ignorance où nous sommes des détails de structure relatifs au site t et au groupement responsable de la toxicité, il vaut mieux laisser en suspens tout essai de représentation exacte. L'hypothèse nous paraît plus utile, formulée en ses termes les plus vagues qu'agrémentée de fausses précisions.

Le groupe t , lorsqu'il est présent sur la molécule de toxine ou d'anatoxine, donne naissance chez l'animal à des anticorps neutralisants que nous proposons d'appeler anticorps a .

Le groupe t_1 donne naissance à des anticorps précipitants et non neutralisants : anticorps a_1 , le groupe t_2 à des anticorps précipitants : anticorps a_2 .

Un point très important reste à préciser : quel est le nombre minimum de groupes semblables t_1 , t_2 , t , sur la molécule de toxine diphtérique ? La détermination expérimentale de la valence maxima de l'antigène ne nous fournit qu'une évaluation globale de la somme des valences, sans permettre en général de distinguer leur caractère qualitatif.

Cette valence maxima a été trouvée égale à 8 ou 12, dans le cas des sérums à γ -antitoxine (tableau XIV). Ce chiffre est obtenu par extrapolation de la courbe A/T (rapport moléculaire anti-corps/toxine dans le précipité).

Dans le cas de la fraction S 1 du sérum 825, on trouve ainsi la valeur 8 pour la valence maxima. Le sérum 825 étant plus riche en anticorps a_1 qu'en anticorps a_2 , la valence de la toxine pour les groupes t_1 doit être supérieure à 4 (8).

La valence de t_1 ne représente qu'une évaluation minima du nombre des groupes t_1 , des empêchements stériques pouvant éventuellement intervenir pour limiter le nombre d'anticorps susceptibles d'entrer en combinaison avec les groupes t_1 , placés sur la molécule.

Quelle que soit la valeur de ces pronostics faits sur la structure

(8) Bien que nous admettions pour simplifier, que les motifs t_1 sont identiques entre eux, on ne peut pas considérer ce point particulier comme établi par nos expériences. On peut en effet supposer aussi que les fragments de molécules de toxine présentant la spécificité « t_1 » doivent leur activité antigénique à une famille de groupes antigéniques t'_1 , t''_1 , t'''_1 etc., distincts les uns des autres mais seulement caractérisés par leur éloignement, sur la molécule, du site t .

Il s'agit là d'un point particulier qui nécessitera une longue et difficile étude, mais qu'il paraît essentiel d'élucider. En établissant l'identité des groupes t_1 entre eux, on prouverait en effet l'existence de restes d'amino-acides à reproduction périodique sur la molécule de toxine.

Nous ne disposons que d'un argument très indirect en faveur de l'identité des groupes t_1 sur une molécule de toxine. Comme il est tiré de l'étude de la réaction toxine-antitoxine tétaniques, nous n'en parlerons pas ici.

de la molécule de toxine, il n'en reste pas moins établi sur des bases purement immunologiques, que les sites t_1 et les anticorps α ,

TABLEAU XIV.

Sérum	Valence maxima de T
341 Début	9
441 Début	12
441 Fin	8
441-S 1 n° 1	8
441-S 1 n° 2	7
441-S 1 n° 3	8
441-gamma prime	8
Lapin L 5 digéré	11
Mouton digéré n° 4	9
Mouton brut n° 5	7
Mouton digéré n° 5	12,5
441-S 2	5
Copenhague antitoxique	6
Copenhague flocculation	4
341 Fin	8 à 9
1451 Fin (NaCl Ψ)	7,5
1451 Fin (1,40 M)	8,2
1451 Fin beta prime (1,40 M)	12
825 total	4,5
825-S 1	8
854-60°	6

jouent un rôle prépondérant dans les combinaisons en excès d'anticorps dans tous les sérums que nous avons examinés.

D'autre part, si l'on admet sous une forme ou sous une autre, la théorie du réseau, il est nécessaire, pour qu'un antigène donne un précipité spécifique avec un anticorps bivalent, qu'il comporte au moins deux sites antigéniques identiques.

Les fragments t_1 et t_2 obtenus par digestion trypsique ménagée donnant des lignes nettes de précipitation avec de nombreux sérum, on peut dès lors admettre que les groupes t_2 (comme les groupes t_1) sont au moins en nombre égal à 2 sur les fragments séparés par digestion et donc sur la molécule intacte.

Reste le problème du nombre des groupes t sur cette même molécule.

On peut faire deux hypothèses à ce sujet :

1° Le groupe t est unique ;

2° Il existe plusieurs groupes t par molécule.

Nous avions accepté cette deuxième hypothèse antérieurement, sans la formuler de façon explicite, en supposant qu'un des systèmes précipitants observable dans la réaction entre la toxine digérée et les sérum antidiphthériques correspondait au système neutralisant [87, 95].

Cette hypothèse conduit à identifier les anticorps neutralisants aux anticorps a_2 .

Le pouvoir neutralisant d'un sérum est en effet d'autant plus élevé que sa teneur en anticorps a_2 est plus forte d'une part. D'autre part, l'élimination sous forme de précipité spécifique des anticorps a_2 par une toxine digérée privée de fragments t_1 (T. D. E.) est accompagnée de l'élimination simultanée du pouvoir neutralisant.

Divers arguments, tirés de l'étude de sérum de mouton hyperimmuns [98] de rapports L+/Lf très élevés, préparés par van Triet [110] nous amènent à penser que cette explication représente probablement une simplification de la situation réelle.

Dans l'incapacité où nous sommes encore de rendre compte de tous les aspects du problème, nous voudrions examiner ici les conséquences de la deuxième hypothèse envisagée, à savoir que le site antigénique t porteur du groupe toxique est unique sur la molécule de toxine.

Les anticorps strictement spécifique pour ce site, s'ils existent, ont été appelés dans cet exposé, anticorps a .

Le système aT ne peut donner (lorsque les anticorps a ne sont pas accompagnés d'anticorps a_1 ou a_2 ou a_3) que des combinaisons solubles. Si les anticorps a sont bivalents, les seules combinaisons possibles sont aT et aT^2 . Toutes deux sont neutres et solubles.

Cette particularité rend compte parfaitement du phénomène de Danysz et de son amplitude maxima. Cinader [14] a montré pour la toxine *Perfringens* α , que c'est lorsque dans un premier temps, on a ajouté 50 p. 100 de la quantité d'anticorps capable de neu-

traliser une quantité donnée de toxine, que l'effet Danysz est maximum.

Par ailleurs, cette hypothèse a une deuxième conséquence. Si un sérum ne contient que des anticorps a , il est neutralisant et non précipitant sans que l'on soit obligé d'admettre que cette propriété résulte d'une structure particulière des anticorps formés (monovalence ou caractère spécial de solubilité par exemple).

Par contre, lorsque le sérum contient des anticorps a_1 ou a_2 en même temps que des anticorps a , ces derniers sont coprécipités, lorsqu'on ajoute de la toxine intacte.

Le caractère non précipitant des anticorps a résulterait, non de la monovalence de l'anticorps, mais de la monovalence de l'antigène pour le site antigénique particulier (t) contre lequel ils sont dirigés.

Cette conception rend compte de résultats particuliers obtenus par Pope [64] qui a pu, par des absorptions partielles effectuées avec des toxines modifiées, éliminer de certains sérums tous les anticorps précipitants et obtenir ainsi des préparations d'antitoxine antidiphétique neutralisante non précipitante.

La démonstration expérimentale directe de cette hypothèse paraît à première vue aisée. On peut envisager deux voies d'abord :

1° Séparer par voie physico-chimique des fragments de la molécule de toxine ne contenant les uns que le groupe t , les autres que des groupes t_1 , les troisièmes que des groupes t_2 , etc., et étudier la réaction observable entre ces fragments immunologiquement purs et les divers types de sérums antidiphétériques.

2° Détruire sélectivement certains des groupes antigéniques, en particulier le groupe t , sur la molécule intacte de toxine.

Nous pensions qu'il serait facile de détruire le groupe t , car on sait que la toxicité est associée à une structure relativement fragile sur la toxine, structure qui disparaît par l'action d'agents dénaturants divers. Dans les quelques essais que nous avons réalisés, les groupes t_1 et t_2 ont disparu en même temps que les groupes t , sous l'influence des agents dénaturants.

Les essais de séparation des fragments t , t_1 , t_2 par chromatographie sur phosphate de calcium ou sur DEAE-cellulose n'ont pas donné non plus les résultats escomptés. Nous avons obtenu de très nombreuses sous-fractions, mais aucune n'était pure du point de vue immunologique, d'après les résultats des précipitations spécifiques en gel.

De nouvelles et longues recherches sont donc encore nécessaires, dont les résultats permettront seuls de choisir parmi les hypothèses envisagées, celles qui correspondent à la réalité.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARR (M.). *J. Path. Bact.*, 1932, **35**, 913.
- [2] BARR (M.) et GLENNY (A. T.). *J. Hyg.*, 1945, **44**, 135.
- [3] BEHRING (E. von) et KITASATO (S.). *Dtsch. Med. Wschr.*, 1890, **16**, 113.
- [4] BOWEN (H. E.) et WYMAN (L.). *J. Immunol.*, 1953, **70**, 235.
- [5] BOWEN (H. E.) et WYMAN (L.). *J. Immunol.*, 1953, **74**, 86.
- [6] BOWEN (H. E.), POLLEY (B. A.) et HUANG (J.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 112.
- [7] BOYD (W. C.). *J. exp. Med.*, 1941, **74**, 369.
- [8] BOYD (W. C.) et PURNELL (M. A.). *J. exp. Med.*, 1944, **80**, 289.
- [9] BOYD (W. C.). *Fundamentals of Immunology*. 1 vol., Interscience Publishers Inc., 1956, 3^e édition.
- [10] BROWN (A. M.). *Brit. J. Exp. Path.*, 1935, **16**, 554.
- [11] CINADER (B.). *Thèse*, Londres, 1948.
- [12] CINADER (B.) et WEITZ (B.). *Nature*, 1950, **166**, 785.
- [13] CINADER (B.) et WEITZ (B.). *J. Hyg.*, 1953, **51**, 293.
- [14] CINADER (B.). *Brit. J. exp. Path.*, 1957, **38**, 362.
- [15] COHN (M.). *Thèse*, New York, 1948.
- [16] COHN (M.) et PAPPENHEIMER (A. M.), Jr. *J. Immunol.*, 1949, **63**, 291.
- [17] DEAN (H. R.) et WEBB (R. A.). *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 473.
- [18] EATON (M. D.). *J. Immunol.*, 1936, **30**, 361.
- [19] FINGER (I.) et KABAT (E. A.). *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 453.
- [20] GLENNY (A. T.) et SÜDMERSEN (H. J.). *J. Hyg.*, 1921, **20**, 176.
- [21] GLENNY (A. T.) et O'KELL (C. C.). *J. Path. Bact.*, 1924, **27**, 187.
- [22] GLENNY (A. T.) et WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1925, **28**, 317.
- [23] GLENNY (A. T.), POPE (C. G.), WADDINGTON (H.) et WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 37.
- [24] GLENNY (A. T.), POPE (C. G.), WADDINGTON (H.) et WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 38.
- [25] GLENNY (A. T.) et BARR (M.). *J. Path. Bact.*, 1931, **34**, 118.
- [26] GLENNY (A. T.) et BARR (M.). *J. Path. Bact.*, 1931, **34**, 131.
- [27] GLENNY (A. T.), BUTTLE (G. A. H.) et STEVENS (M. F.). *J. Path. Bact.*, 1931, **34**, 267.
- [28] GLENNY (A. T.) et BARR (M.). *J. Path. Bact.*, 1932, **35**, 91.
- [29] GLENNY (A. T.), BARR (M.), ROSE (H. E.) et STEVENS (M.). *J. Path. Bact.*, 1932, **35**, 495.
- [30] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.), Jr. *Bioch. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
- [31] GRABAR (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 65.
- [32] GRABAR (P.), WILLIAMS (C. A.), Jr, COURCON (J.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 67.
- [33] HEIDELBERGER (M.). *Bact. Rev.*, 1939, **3**, 49.
- [34] HITCHENS (A. T.) et TINGLEY (E. K.). *J. Immunol.*, 1917, **2**, 395.
- [35] JERNE (N. K.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1951, *suppl. 87*.
- [36] KEKWICK (R. A.) et RECORD (B. R.). *Brit. J. exp. Path.*, 1941, **22**, 29.
- [37] KEKWICK (R. A.). *Chem. Industr.*, 1941, **60**, 486.
- [38] KEKWICK (R. A.), MACFARLANE (M. G.), KNIGHT (B. C. J. G.) et RECORD (B. R.). *Lancet*, 1941, **1**, 571.

- [39] LAPRESLE (Cl.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 969.
- [40] LAPRESLE (Cl.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 654.
- [41] LAPRESLE (Cl.) et DURIEUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 62.
- [42] LAPRESLE (Cl.) et DURIEUX (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, 883.
- [43] LAPRESLE (Cl.) et DURIEUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 38.
- [44] LAPRESLE (Cl.), KAMINSKI (M.) et TANNER (C. E.). *J. Immunol.*, 1959, **82**, 94.
- [45] LAPRESLE (Cl.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959.
- [46] LEVINE (L.). *Brit. J. exp. Path.*, 1952, **33**, 190.
- [47] LINNEWEAVER (H.) et MURRAY (C. W.). *J. biol. Chem.*, 1947, **171**, 565.
- [48] LOCKE (A.) et MAIN (E. R.). *J. inf. Dis.*, 1928, **43**, 420.
- [49] MCSWEENEY (C. J.). *Lancet*, 1941, **1**, 208.
- [50] MARRACK (J. R.). *Medical Research Council*, 1938, Spec. Report, Series n° 230, p. 156.
- [51] MARRACK (J. R.). *Intern. Arch. Allergy*, 1958, **12**, 21.
- [52] MÖRCH (J. R.) et SCHMIDT (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 1293.
- [53] MÖRCH (J. R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 545.
- [54] NORTHRUP (J. H.). *J. gen. Physiol.*, 1942, **25**, 465.
- [55] OUCHTERLONY (O.). *Arkiv Kemi Miner Geolog.*, 1949, **26**, B, n° 14, 1.
- [56] PAPPENHEIMER (A. M.) et ROBINSON (E. S.). *J. Immunol.*, 1937, **32**, 291.
- [57] PAPPENHEIMER (A. M.), Jr. *J. Bact.*, 1942, **43**, 273.
- [58] PAPPENHEIMER (A. M.) et YONEDA (M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1957, **38**, 194.
- [59] PETERMAN (M. L.) et PAPPENHEIMER (A. M.), Jr. *J. physical Chem.*, 1941, **45**, 1.
- [60] PETERMAN (M. L.). *J. physical Chemistry*, 1942, **46**, 183.
- [61] PILLEMER (L.), BENTOFF (J.), BROWN (E.) et LEPOW (I. H.). *J. Immunol.*, 1950, **65**, 591.
- [62] POPE (C. G.) et HEALEY (M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 213.
- [63] POPE (C. G.), STEVENS (M. F.), CASPARY (E. A.) et FENTON (E. L.). *Brit. J. exp. Path.*, 1951, **32**, 246.
- [64] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 56.
- [65] POPE (C. G.). *Discus. Faraday Soc.*, 1954, **18**, 323.
- [66] POPE (C. G.). *Brit. J. exp. Path.*, 1957, **38**, 207.
- [67] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1958, **39**, 150.
- [68] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1958, **39**, 386.
- [69] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1958, **39**, 490.
- [70] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661.
- [71] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 711.
- [72] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 813.
- [73] RAMON (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1923, **177**, 1338.
- [74] RAMON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1923, **37**, 1001.
- [75] RAMON (G.). *G. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 2.
- [76] RAMON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, **38**, 1.
- [77] RAMON (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **178**, 1436.
- [78] RAMON (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **179**, 422.
- [79] RAMON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1925, **39**, 1.
- [80] RAMON (G.). *Rec. Méd. Vétér.*, 1925, **101**, 227.
- [81] RAMON (G.). *Rec. Méd. Vétér.*, 1925, **101**, 348.
- [82] RAMON (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1925, **181**, 157.

- [83] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 485.
- [84] RAMON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **47**, 339.
- [85] RAMON (G.). *Rev. Immunol.*, 1937, **3**, 193.
- [86] RAMON (G.), LEMÉTAYER (E.) et RICHOU (R.). *Rev. Immunol.*, 1937, **3**, 202.
- [87] RAYNAUD (M.). *Henry Ford Hospital Intern. Symposium*, 1958. Mechanism of Hypersensitivity. Little, Brown et Co, Boston. 1 vol., 1959, p. 27.
- [88] RAYNAUD (M.), RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.) et CORVAZIER (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 129.
- [89] RAYNAUD (M.), RELYVELD (E. H.), TURPIN (A.) et MANGALO (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 60.
- [90] RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *Ann. Inst. Pasteur* (à paraître).
- [91] RELYVELD (E. H.), GRABAR (P.), RAYNAUD (M.) et WILLIAMS (C. A.). Jr. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 688.
- [92] RELYVELD (E. H.) et RAYNAUD (M.). *Protides of the Biological Fluids. Proceedings of the 5th Colloquium*. Bruges, 1957, p. 147, 1 vol., Elsevier Publishing C°, Amsterdam.
- [93] RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 631.
- [94] RELYVELD (E. H.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 246.
- [95] RELYVELD (E. H.). *Thèse Sciences*, Paris, 1958, Hermann, édit., (à paraître).
- [96] RELYVELD (E. H.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 537.
- [97] RELYVELD (E. H.) et BEN EFRAIM (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959 (à paraître).
- [98] RELYVELD (E. H.), TRIET (A. J. van) et RAYNAUD (M.). *Anth. van Leeuwenhoeck*, 1959 (à paraître).
- [99] ROTHEM (A.). *J. gen. Physiol.*, 1942, **25**, 487.
- [100] ROUX (E.) et YERSIN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, **2**, 40.
- [101] SANDOR (G.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1940, **22**, 129.
- [102] SANDOR (G.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1174.
- [103] SCHMIDT (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 765.
- [104] SCHMIDT (S.) et STEENBERG (E.). *Acta path. microb. scand.*, 1936, **13**, 40.
- [105] SORDELLI (A.). *C. R. Soc. biol.*, 1921, **85**, 314.
- [106] TAYLOR (G. L.). *J. Hyg.*, 1931, **31**, 56.
- [107] TAYLOR (G. L.). *J. Hyg.*, 1933, **33**, 12.
- [108] TAYLOR (G. L.) et ADAIR (M. E.). *J. Hyg.*, 1935, **35**, 169.
- [109] TIMMERMAN (W. A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1934, **52**, 146.
- [110] TRIET (A. J. van). *Brit. J. exp. Path.*, 1959 (à paraître).
- [111] WADSWORTH (A.), QUIGLEY (J. J.) et SICKLES (G. R.). *J. inf. Dis.*, 1937, **61**, 237.
- [112] WILLIAMS (C. A.), Jr. *VI^e Congrès Intern. Microbiol.*, Rome, 1953, **2**, 145.
- [113] WILLIAMS (C. A.), Jr. et GRABAR (P.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 158, 397 et 404.
- [114] YEU (F.) et PAVAGEAU (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 240 et 482.

LA RÉACTION HAPTÈNE-ANTIHAPTÈNE

par J.-M. DUBERT.

(*Institut Pasteur*)

L'intérêt du système haptène-antihaptène réside essentiellement dans le fait que la nature, le nombre et les relations spatiales des groupements qui peuvent être intéressés par les liaisons spécifiques sont parfaitement connus.

L'analyse de tels systèmes par les méthodes classiques de précipitation a permis d'établir sans ambiguïté certaines propriétés fondamentales des populations d'anticorps. Au cours de ces dernières années de nouvelles méthodes d'analyse ont été appliquées à l'étude des anticorps antihaptènes, en particulier la méthode de dialyse à l'équilibre qui permet de définir les caractéristiques physicochimiques de la combinaison réversible entre haptènes et anticorps et la méthode de fractionnement en présence d'adsorbants spécifiques solides. Nous envisagerons successivement les méthodes analytiques qui ont été développées pour l'étude des systèmes haptène-antihaptène et les principaux résultats qui ont pu ainsi être obtenus, en insistant sur quelques problèmes posés par ces études.

MÉTHODOLOGIE.

Très généralement, les anticorps antihaptènes sont obtenus en réponse à l'injection d'antigènes complexes constitués d'une partie protéique à laquelle a été chimiquement fixé l'haptène. La réaction de diazotation a été largement utilisée par les immunologistes, depuis les travaux de Landsteiner, pour coupler aux protéines des amines aromatiques diversement substituées. D'autres techniques applicables à des haptènes de différentes natures ont été proposées. Quel que soit le système particulier envisagé, les antisérum obtenus en réponse à ces antigènes complexes contiennent au moins trois types d'anticorps : les anticorps spécifiques de la protéine originale non conjuguée, les anticorps adaptés au groupe hapténique et sans doute à la partie adjacente de la protéine, et des anticorps spécifiques des structures protéiques altérées par suite de la conjugaison avec l'haptène. Il importe que les méthodes utilisées pour l'étude des

anticorps antihaptènes fassent intervenir uniquement ces anticorps à l'exclusion des anticorps antiprotéines simultanément obtenus au cours de l'immunisation. Cette exigence est pratiquement satisfaite lorsque des tests de précipitation sont réalisés entre l'immunsérum et un haptène couplé à une protéine entièrement différente de la protéine utilisée comme antigène, ou lorsque l'on étudie l'inhibition par divers haptènes de la réaction de précipitation entre l'immunsérum et la protéine conjuguée utilisée comme antigène. Ces méthodes ont été décrites par Landsteiner [1] et, utilisées uniquement de façon qualitative, elles ont permis à cet auteur de définir les caractéristiques fondamentales de ces systèmes. Ces techniques sont susceptibles d'une analyse quantitative, et les travaux de Pauling, Pressman et Grossberg [2] nous en apporteront un exemple.

La méthode la plus directe cependant consiste à étudier la combinaison entre l'anticorps et l'haptène par la technique de dialyse à l'équilibre. Les complexes formés entre les anticorps et l'haptène sont solubles et, par l'artifice de la membrane perméable seulement aux petites molécules, il est possible de déterminer la quantité d'haptène lié aux anticorps pour différentes concentrations d'haptène libre, lorsqu'est atteint l'équilibre entre les deux compartiments séparés par la membrane. Ces données expérimentales permettent de calculer la constante d'association du système haptène-anticorps antihaptène et l'énergie libre de cette association.

C'est en 1932 que Marrack et Smith [3] ont appliqué pour la première fois cette technique à l'analyse d'anticorps antihaptènes. Ces auteurs ont montré que les globulines d'un animal hyperimmunisé avec une azoprotéine se combinent spécifiquement à l'haptène. En 1933, Haurowitz et Breinl [4] mettaient de la même façon en évidence la combinaison de l'acide arsanilique avec un antisérum spécifique. Plus récemment, Eisen et Karush (1949) [5], Carsten et Eisen (1955) [6], Karush (1956 et 1957) [7, 8], Nisonoff et Pressman (1958) [9, 10], ont apporté, grâce à cette méthode qu'ils ont grandement améliorée, une série de déterminations précises.

Je décrirai brièvement le dispositif que j'ai utilisé (Dubert, *Thèse* [11]) : il ne diffère de celui décrit par Karush et par Eisen que par un certain nombre de détails techniques.

Ce dispositif symétrique (*Cf. Thèse*, p. 69) consiste en l'assemblage de deux éléments identiques séparés par une membrane de dialyse. Chaque élément est simplement la partie supérieure de bouteilles utilisées pour le conditionnement de la pénicilline. La cohésion de l'ensemble est assurée par une pince munie d'un fort ressort. Chaque pince est ensuite fixée au pourtour d'une roue à axe horizontal tournant à la vitesse d'environ 3 tours par

minute. L'agitation est poursuivie jusqu'à ce que l'équilibre entre les deux compartiments soit atteint. Ce temps est fonction de la température à laquelle est réalisée l'expérience. Les mêmes quantités d'haptène et de globulines sont distribuées, sous un même volume, dans chacun des deux compartiments, mais dans le premier compartiment se trouvent les globulines à analyser provenant d'un animal immunisé ; dans le second compartiment des globulines provenant d'un animal non immunisé.

L'analyse graphique des résultats obtenus par ces déterminations d'équilibre effectuées à différentes concentrations d'haptène libre permet de définir quantitativement l'affinité des sites spécifiques des anticorps pour l'haptène. Nous supposerons au cours des calculs suivants que tous les sites spécifiques des anticorps ont la même affinité pour l'haptène et que la liaison d'un site avec l'haptène ne modifie pas l'aptitude à réagir des autres sites présents sur la même molécule. Ces hypothèses n'ont d'autre justification que de simplifier l'analyse du phénomène. L'écart entre les prévisions théoriques et les faits observés réduira l'hétérogénéité éventuelle de la population d'anticorps.

La relation (1) rend compte de la réaction réversible de fixation de l'haptène au niveau des sites spécifiques :



Le symbole C représente la concentration d'haptène libre, M la concentration des anticorps, r le nombre moyen de sites liés à un haptène par molécule d'anticorps et r' le nombre moyen de sites libres par molécule d'anticorps. Soit n le nombre de sites spécifiques par molécule d'anticorps, on a :

$$n = r + r' \quad (2)$$

et par conséquent à l'équilibre :

$$\frac{r' \cdot C}{r} = \frac{(n-r)}{r} C = K_D \quad (3)$$

ou

$$\frac{r}{(n-r) C} = K_A \quad (4)$$

selon que l'on considère la constante de dissociation K_D ou la constante d'association K_A .

L'analyse peut dès lors être conduite de la manière décrite par Scatchard (1949) [42]. Par transformation de l'équation (4), on obtient :

$$r/C = n \cdot K_A - r \cdot K_A \quad (5)$$

Si l'on porte les valeurs de R en abscisses et de r/C en ordonnées, on doit obtenir une droite de pente $-K_A$ coupant l'axe des abscisses pour une valeur de r égale à n . C'est cette analyse graphique des résultats qui a été utilisée par Karush et Eisen : l'intersection avec l'axe des abscisses a lieu pour une valeur égale à 2, mais la courbe obtenue n'est pas une droite, ce qui traduit l'hétérogénéité des sites quant à leur affinité pour l'haptène. Si la valeur de C est une donnée expérimentale immédiate — c'est la concentration d'haptène dans le compartiment où ne se trouvent pas les anticorps — les valeurs de r ne peuvent être calculées que si l'on connaît la quantité d'anticorps présents. La détermination graphique de K_A est indépendante de cette quantité d'anticorps puisque les valeurs portées en abscisses et en ordonnées sont inversement proportionnelles à cette quantité.

Les travaux de Karush ont été effectués avec des solutions pratiquement pures d'anticorps obtenus par élution d'un précipité spécifique à l'aide d'une solution concentrée d'haptène ; la quantité d'anticorps était ainsi exactement déterminée. La nécessité d'une purification préalable des anticorps présente l'inconvénient d'imiquer une sélection des anticorps : des anticorps de faible affinité peuvent ne pas précipiter (Eisen, Carsten et Belman [13]) ; des anticorps d'affinité particulièrement élevée peuvent ne pas être clués du précipité spécifique.

L'expression graphique que nous proposons [44] n'implique pas une détermination indépendante de la quantité d'anticorps réagissants.

Une donnée expérimentale directe obtenue par dialyse à l'équilibre est le rapport R entre la concentration d'haptène dans le compartiment contenant les anticorps et la concentration d'haptène dans l'autre compartiment. La concentration dans le premier compartiment est égale à la somme de la concentration d'haptène libre C et de la concentration des haptènes liés aux anticorps : soit M la concentration molaire des anticorps, et r le nombre d'haptènes liés à chaque molécule d'anticorps, on a :

$$R = \frac{M \cdot r + C}{C} \quad (6)$$

En retranchant 1 à R on obtient une nouvelle valeur, ϱ , qui est égale au rapport de la concentration d'haptène lié aux anticorps à la concentration d'haptène libre :

$$\varrho = \frac{M \cdot r}{C} = R - 1 \quad (7)$$

Des équations (3) et (7) ont tiré la relation suivante :

$$C = nM(1/\varrho) - K_D \quad (8)$$

C et $1/q$ sont des données expérimentales. Si l'on porte en abscisses les valeurs de $1/q$ et en ordonnées les valeurs de C , la courbe doit être une droite dont la pente est égale à la molarité des sites spécifiques (nM) et dont l'intersection avec l'axe des ordonnées définit la valeur de $-K_D$.

Cette analyse ne permet pas de définir n ou M mais seulement le produit nM . Il serait intéressant d'obtenir simultanément par une méthode indépendante la valeur de M pour en déduire la valeur de n . Quoi qu'il en soit le produit nM a en lui-même une signification simple : il exprime la concentration molaire des sites.

Très récemment, Nisonoff et Pressman (1958) [9, 10] ont étudié graphiquement les résultats de dialyses à l'équilibre en portant en abscisses l'inverse de la concentration d'haptène libre et en ordonnées l'inverse de la concentration d'haptène lié aux anticorps. Cette analyse présente également l'avantage de ne pas nécessiter une détermination indépendante de la quantité d'anticorps et de caractériser l'hétérogénéité des anticorps à partir de données expérimentales immédiates. Cependant la pente des droites ou des courbes ainsi obtenues ne présente pas une signification simple. Selon la notation que nous avons employée, l'équation utilisée par ces auteurs s'écrirait :

$$(1/C_q) = \frac{K_D}{nM} \frac{(1)}{(C)} + \frac{1}{nM}$$

La pente est donc fonction à la fois de K_D et de nM . Il suffit de multiplier les deux termes de cette équation par nM/C pour retrouver l'équation (8). Exprimée avec les mêmes symboles, l'équation de Scatchard (5), après multiplication par $(K_D M/q)$, devient également identique à cette équation (8).

Supposons l'existence de deux solutions d'anticorps de même spécificité, mais de concentrations et de constantes d'affinité différentes. Chaque solution, par l'analyse graphique que nous proposons, sera caractérisée par une droite. Si par le même procédé nous analysons un mélange de ces deux solutions, on obtient une courbe, qu'il est d'ailleurs possible de construire à partir des deux droites précédemment obtenues. Inversement, l'obtention d'une courbe non rectiligne traduit l'hétérogénéité des anticorps analysés.

Il convient ici d'insister sur le fait que dans le cas où la population d'anticorps est hétérogène, les anticorps de haute affinité masquent les anticorps d'affinité faible. Pour une concentration donnée d'haptène libre, la fraction des anticorps combinés à l'haptène est de 50 p. 100 si les anticorps ont pour cet haptène une constante de dissociation égale à cette concentration. Cette

fraction est égale à 91 p. 100 si la constante de dissociation est dix fois plus faible, et à 9 p. 100 si la constante de dissociation est dix fois plus élevée. L'analyse effectuée à des concentrations d'haptène très faibles porte donc essentiellement sur les anticorps de haute affinité.

L'analyse que nous venons de développer s'applique au cas où l'équilibre est déterminé en présence de différentes concentrations d'un même haptène. Il est possible également d'étudier l'inhibition de la fixation d'un haptène donné par des concentrations croissantes de divers analogues structuraux de cet haptène. Cette technique permet de mettre en évidence l'existence d'affinités extrêmement faibles pour certains des analogues alors qu'aucun déplacement d'équilibre ne serait susceptible de se manifester par une mesure directe.

Le recours à la méthode d'inhibition est indispensable pour un analogue structural dont il n'est pratiquement pas possible de mesurer les concentrations, toujours faibles, dans chacun des compartiments. L'effet inhibiteur de cet analogue sur la fixation d'un autre haptène n'en est pas moins mesurable. Afin de déterminer une valeur moyenne de la constante d'association, Karush [7] utilisait des concentrations d'haptène homologue et d'inhibiteur telles que les quantités de ces deux substances liées aux anticorps soient du même ordre. Si, par contre, comme nous l'avons proposé, l'haptène dont on mesure la fixation est présent à une concentration extrêmement faible, la fraction des sites spécifiques qui se trouvent à un instant donné en liaison avec l'haptène est faible ; s'il existe une population de sites caractérisés par des affinités différentes pour cet haptène, ce seront naturellement les sites à forte affinité qui seront engagés préférentiellement dans cette liaison. L'étude effectuée dans ces conditions par la technique d'inhibition porte donc électivement sur les anticorps qui ont pour l'haptène choisi l'affinité la plus élevée, et cela sans aucun épuisement ni fractionnement préalable des globulines. Les propriétés de composants mineurs d'une population d'anticorps sont ainsi susceptibles d'être mises directement en évidence. La validité de cette méthode d'analyse et sa sensibilité sont démontrées par des expériences de reconstitution. Des globulines obtenues en réponse à l'injection de deux azoprotéines de structure voisine sont mélangées en proportion variable. Le composant mineur est aisément détecté par cette méthode, même s'il représente seulement 1 p. 100 de la totalité des anticorps présents dans le mélange [14].

Il faut mettre en parallèle avec les études effectuées par dialyse à l'équilibre les expériences réalisées par Doty et Epstein [14], grâce à la méthode de diffusion latérale de la lumière. Dans ce cas, les haptènes sont polyvalents et l'agrégation des globulines

spécifiques provoquée par ces haptènes est quantitativement mesurée par la lumière diffusée.

Nous avons mentionné l'utilisation faite par certains auteurs de préparations purifiées d'anticorps antihaptènes. La relative facilité avec laquelle de telles préparations peuvent être obtenues nous paraît être un des aspects méthodologiques caractéristiques de l'étude des anticorps antihaptènes.

De très nombreuses méthodes ont été décrites qui permettent d'obtenir une grande variété d'anticorps dans un état d'assez grande pureté. Il s'agit soit de méthodes spécifiques, impliquant dans une première étape la combinaison des anticorps avec l'antigène, soit de méthodes non spécifiques. Dans un cas comme dans l'autre, les problèmes posés par cette purification ne sont pas susceptibles d'une solution générale et les solutions apportées, souvent ingénieuses, dépendent de quelque propriété singulière des anticorps ou des antigènes particuliers envisagés. Une revue très complète à ce sujet a été faite récemment par Cann [15]. Dans le cas des anticorps antihaptènes, les méthodes spécifiques peuvent être appliquées dans des conditions particulièrement favorables. Les anticorps antihaptènes sont tout d'abord précipités, à l'exclusion des anticorps antiprotéines obtenus simultanément au cours de l'immunisation, soit par un haptène polyvalent, soit par l'haptène conjugué à une protéine différente de celle utilisée pour synthétiser l'antigène complexe. La dissociation du précipité est aisément réalisée en présence d'une concentration suffisante d'haptène, à pH neutre, et par conséquent sans danger de dénaturation. L'étape suivante consiste à séparer les anticorps de l'antigène et de l'haptène présents. Dans ce but l'insolubilité des azocomposés en milieu acide ou en présence de sels de baryum a été utilisée [16, 17, 18]. L'haptène lui-même est éliminé par dialyse prolongée des anticorps obtenus. Karush a utilisé le fibrinogène conjugué à l'haptène comme antigène précipitant et a pu ainsi, après dissociation, précipiter cet antigène par le sulfate d'ammonium à une concentration de 0,8 M puis, secondairement, les anticorps eux-mêmes à une concentration de 2 M. Dans ce dernier procédé, à aucun moment n'intervient un traitement susceptible de dénaturer les anticorps.

Les anticorps antihaptènes peuvent être purifiés également à la suite de leur adsorption à un antigène complexe insoluble. Après dissociation, une simple centrifugation permet de séparer les anticorps. Ce principe a été pour la première fois appliqué par Landsteiner et Van der Scheer [19], l'adsorbant étant des stromas de globules rouges couplés à l'haptène par diazotation. L'ovalbumine coagulée par la chaleur et diazotée a été utilisée comme adsorbant par Lerman [20].

Une solution particulièrement élégante à ce problème a été

apportée par Campbell, Luescher et Lerman (1951) [21] et par Lerman (1953) [22]. L'adsorbant est de la poudre de cellulose chimiquement couplée à l'haptène. L'addition à chaud en milieu alcalin d' α -bromo-*p*-nitrotoluène entraîne la fixation à la cellulose du radical nitrotoluène. Après réduction en groupements amino-toluène, le sel de diazonium est formé et, par son intermédiaire, la cellulose est couplée au résorcinol. Il est dès lors possible de fixer l'haptène au composé ainsi formé par une réaction de diazotation. Si on fait passer à travers une colonne de cellulose ainsi traitée un antisérum ou les globulines séparées à partir de ce sérum, les anticorps antihaptènes sont retenus sur la colonne et les protéines sans affinité pour l'haptène sont éliminées par lavage avec une solution tampon ou de l'eau physiologique. Les anticorps antihaptènes peuvent ensuite être élusés par une solution concentrée d'haptène puis séparés de l'haptène par dialyse. Nous avons utilisé cette méthode pour séparer les anticorps antihaptènes à partir d'un sérum anti-azoprotéine. Alors que l'antisérum contenait des anticorps antiprotéine qui provoquaient une hémagglutination passive à la dilution 1/10 000, la préparation d'anticorps antihaptène obtenue à partir de ce sérum n'agglutinait pas les hématies tannées et sensibilisées avec la protéine antigénique. Le titre était certainement inférieur à 1/10 : les protéines non spécifiques pour l'haptène, s'il en existait dans cette préparation, représentaient moins d'un millième des protéines présentes dans un même volume d'antisérum. Cette méthode d'adsorption permet donc, en une seule étape et sans risque de dénaturation, d'obtenir des préparations hautement purifiées d'anticorps. Elle semble susceptible d'un emploi très général.

L'élution fractionnée des anticorps adsorbés peut également constituer une méthode analytique de choix. Défini par Lerman [22], ce type d'analyse n'a cependant donné lieu jusque-là à aucune étude systématique. L'emploi de globulines de haute radioactivité spécifique apporterait une grande sensibilité à de semblables analyses.

Par les différentes méthodes de purification que nous venons de décrire, des préparations très purifiées d'anticorps ont été obtenues. Il faut remarquer que ces préparations analysées par une technique rigoureuse ne se sont qu'exceptionnellement révélées entièrement précipitables par l'antigène. Ces résultats suggèrent plutôt l'existence d'anticorps non précipitants que la présence de protéines non spécifiques entraînées avec les anticorps antihaptènes au cours du processus de purification. Ces techniques ouvrent une voie d'abord nouvelle pour l'étude de ces anticorps.

Les conditions d'immunisation doivent être brièvement envisagées. Tous les travaux sur les anticorps antihaptènes ont été réalisés à partir d'immunsérum obtenu par hyperimmunisation.

en général à la suite d'injections bi- ou tri-hebdomadaires poursuivies pendant plusieurs semaines. Il ne semble pas que des anticorps antihaptènes soient détectables après une brève immunisation, contrairement à ce que l'on observe pour les anticorps antiprotéines. Cependant, après une hyperimmunisation avec, par exemple, une azoprotéine, les quantités d'anticorps antihaptènes et d'anticorps antiprotéines sont du même ordre. Les raisons de ces différences restent obscures.

Par définition les haptènes sont des substances qui sont susceptibles de réagir avec les anticorps spécifiques, mais qui ne peuvent provoquer à eux seuls la formation d'anticorps. Nous avons vu, en effet, qu'il est nécessaire de les coupler chimiquement à des protéines, qui peuvent d'ailleurs être les protéines de l'individu immunisé lui-même, pour qu'ils exercent leur action immunogène. Loiseleur [23] a cependant montré qu'un très grand nombre de substances de poids moléculaire très faible peuvent, à la suite d'injections fréquemment répétées, provoquer une réponse immunitaire : l'addition de ces substances à l'immunsérum obtenu entraîne des modifications de viscosité. La définition des haptènes ne peut donc être conservée. L'étude des anticorps antihaptènes constitue cependant un domaine bien individualisé de l'immunologie, aussi bien par la nature des composés immunogènes que par les méthodes analytiques applicables à l'étude de la réaction haptène-antihaptène.

RÉSULTATS.

Les deux observations majeures effectuées grâce au système haptène-antihaptène ont trait, d'une part, à l'hétérogénéité des anticorps et, d'autre part, à la stricte complémentarité structurale entre les motifs spécifiques des anticorps et le groupement immunogène. La rigueur des démonstrations apportées par ces études tient à l'extraordinaire diversité d'haptènes utilisables et à la possibilité de définir les constantes d'affinité des différents systèmes envisagés.

L'hétérogénéité observée dans ces conditions prend toute sa signification du fait que le motif immunogène est, tout au moins en première approximation, unique. C'est en 1936 que Landsteiner et Van der Scheer [49] ont montré que les antisérumspécifiques d'une azoprotéine donnée ne contiennent pas un seul type d'anticorps antihaptènes mais des groupes d'anticorps distincts par leur réactivité envers divers haptènes de structure voisine. Une fraction différente des anticorps intervient préférentiellement dans chacune des réactions croisées envisagées et l'intensité de ces réactions croisées varie d'un individu à un autre. Cependant la totalité des anticorps d'un antisérum donné peut réagir avec

chacun des analogues structuraux de l'haptène homologue puisqu'il est possible d'obtenir une inhibition complète de la réaction homologue en présence d'une concentration suffisamment élevée des analogues. Des observations semblables, traduisant l'hétérogénéité des anticorps, avaient été faites avec des antigènes naturels, mais elles étaient généralement interprétées comme étant dues à l'existence de différents déterminants antigéniques. Une telle interprétation, sans doute souvent valable pour les antigènes naturels, ne pouvait être retenue dans le cas des anticorps anti-haptènes.

L'hétérogénéité des anticorps peut être également mise en évidence dans la réaction avec l'haptène homologue, et la première étude quantitative de ce type a été effectuée par Pauling, Pressman et Grossberg [2]. Leur technique consistait à mesurer l'inhibition de la précipitation du système antisérum-anticorps homologue par des quantités croissantes d'haptène. Aux très faibles concentrations d'haptène, les anticorps se sont révélés homogènes. Pour des concentrations plus élevées d'haptène ces auteurs ont montré que les déterminations effectuées étaient compatibles avec l'existence d'une population d'anticorps dont l'hétérogénéité serait décrite par une fonction d'erreur dans l'énergie libre de combinaison de l'haptène avec l'anticorps. Les résultats de Eisen et Karush (1949), de Karush (1956), de Nisonoff et Pressman (1958) [5, 7, 9], obtenus par la méthode de dialyse à l'équilibre, peuvent être également interprétés de cette façon. Pauling, Pressman et Grossberg [2] ont montré que l'indice d'hétérogénéité de la fonction d'erreur s'accroît lorsque l'haptène inhibiteur est hétérologue et cela d'autant plus que, par suite de modifications de structure plus importantes, l'haptène présente une constante d'association moyenne plus faible. En d'autres termes, plus l'haptène hétérologue diffère de l'haptène homologue, plus les anticorps se révèlent hétérogènes à son égard.

Dans les expériences que nous avons réalisées grâce à la technique de dialyse à l'équilibre, les haptènes utilisés étaient radioactifs. Il s'agissait des composés monoazoïques de la ^{14}C -1-tyrosine et des acides méta- ou para-aminobenzène sulfoniques. Grâce à la radioactivité spécifique élevée de ces composés, nous avons pu effectuer des déterminations d'équilibre à des concentrations très faibles d'haptène libre. Les valeurs de la constante de dissociation que nous avons déterminées pour les systèmes anticorps azotyrosine homologue ont été de $1 \text{ à } 3.10^{-7} \text{ M}$. C'est la valeur la plus faible qui ait été jusque-là mesurée pour un système haptène-anticorps antihaptène. C'était également la première fois que les mesures étaient effectuées jusqu'à des concentrations minimum d'haptène libre de l'ordre de $10^{-7} \text{ à } 10^{-8} \text{ M}$.

La valeur de la constante de dissociation dépend-elle des concen-

trations d'haptènes avec lesquelles elle a été déterminée ? Talmage (1957) [24] a émis cette hypothèse après avoir remarqué que les valeurs déterminées pour K_D par différents auteurs, bien que variant dans le rapport de 1 à 10 000, sont peu différentes des plus faibles valeurs des concentrations d'haptène ou d'antigène utilisées dans chacune de ces déterminations. Pour tenter d'expliquer cette remarquable coïncidence, Talmage suppose l'existence d'un spectre continu d'affinités, la fréquence relative de chaque type de site étant d'autant plus élevée que son affinité pour l'antigène est plus faible. A une extrémité de ce spectre se trouveraient, en grande quantité, des globulines que leur très faible affinité pour l'antigène ne permettrait pas de distinguer des globulines normales ; à l'autre extrémité du spectre, des globulines d'affinité très élevée présentes en quantité très faible. Cette notion d'un spectre continu d'affinités — qui est un des traits caractéristiques de la théorie de Jerne [25] — a été d'abord suggérée par cet auteur en 1952 ; Pauling (1954) [26] a également montré qu'une telle distribution était une conséquence logique de sa théorie antérieurement formulée sur la formation des anticorps.

Cette conception séduisante n'est appuyée que sur six observations seulement, rassemblées par Talmage (1957, p. 236 [24]). Les valeurs de la constante de dissociation ont été obtenues par Singer et Campbell (1955) [27] d'une part et par Farr (1956-1957) [28] d'autre part, pour un même antigène, l'albumine bovine, la constante de dissociation étant dans ce cas déterminée par une technique originale décrite par ces auteurs. Le principe de cette méthode est de séparer l'antigène libre de l'antigène engagé dans des complexes solubles avec les anticorps, par précipitation en présence d'une concentration convenable de sulfate d'ammonium. Pour des concentrations d'antigène variant de $30 \text{ à } 120 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (Singer et Campbell) et de $6 \text{ à } 60 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (Farr) les constantes de dissociation ont été respectivement de $4 \cdot 10^{-5}$ et de $0,6 \text{ à } 60 \cdot 10^{-8}$. Pour les anticorps antihaptènes (Eisen et Karush, 1949 [5] ; Carsten et Eisen, 1955 [6]) les valeurs de K_D sont beaucoup plus groupées, entre $3 \text{ et } 30 \cdot 10^{-6}$, mais les concentrations d'haptènes ne varient de leur côté qu'entre $5 \text{ et } 100 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, des concentrations plus faibles de ces haptènes, pourtant fortement colorés, n'étant pas mesurables par spectrophotométrie.

Nos propres observations viennent appuyer l'hypothèse de Talmage en montrant que pour les haptènes aussi bien que pour les protéines, l'utilisation de concentrations extrêmement faibles entraîne la détermination, pour la constante de dissociation, de valeurs également faibles. La plupart de nos mesures ont été effectuées pour des concentrations d'haptènes variant de $0,3 \text{ à } 30 \cdot 10^{-7} \text{ M}$; les valeurs de K_D ont été de $1 \text{ à } 3 \cdot 10^{-7}$.

Ces différents résultats concordent en ce qu'ils permettent d'envi-

sager une relation entre les concentrations d'haptène utilisées et les constantes de dissociation déterminées. Mais ces observations sont en fait très peu nombreuses et, surtout, ont été effectuées dans des conditions expérimentales très différentes. Signalons par exemple que nos expériences ne diffèrent pas seulement des expériences de Eisen et de Karush par les concentrations d'haptène utilisées, mais aussi par la nature de l'haptène et le mode d'immunisation des animaux. Il serait nécessaire qu'une étude systématique soit faite avec un système unique.

Les différentes observations rapportées au cours de cette discussion ne laissent guère de doute sur le fait que les populations d'anticorps sont hétérogènes, mais les données que nous possérons ne permettent pas de dire si une relation du type envisagé par Talmage existe ou non.

En revanche, il faut insister sur le fait que l'emploi d'un haptène unique ne peut en aucune façon garantir l'homogénéité du matériel immunogène et que, par conséquent, l'hétérogénéité observée peut, pour une part tout au moins, refléter l'hétérogénéité des motifs antigéniques eux-mêmes.

En effet, même lorsqu'on utilise un haptène unique, on doit tenir compte de ce que la diazotation fixe cet haptène en des points variés de la molécule de protéine. La fixation s'effectue à la place d'un seul ou des deux hydrogènes mobiles des radicaux tyrosyl ou histidyl, et probablement en d'autres points puisque l'on peut fixer par diazotation un nombre de groupements hapténiques bien plus élevé que celui correspondant à la saturation de tous les radicaux tyrosyl et histidyl (Boyd et Hooker, 1934) [29]. Ces acides aminés de plus sont liés dans les chaînes peptidiques à différentes séquences. De très nombreux motifs antigéniques sont ainsi constitués. Or, Pauling, Pressman et Grossberg (1944) [2] ont montré que la réactivité des anticorps pour une même partie du motif hapténique est conditionnée par l'ensemble du motif antigénique dans lequel il est inclus : selon que les anticorps étaient obtenus en réponse à une protéine azo-*p*-phényl arsonique ou à une même protéine azo-*p*-(*p*-aminophényl azo)phényl arsonique, ils réagissaient de façon qualitativement différente avec l'acide arsanilique, les anticorps du premier type lui étant plus étroitement adaptés.

Il apparaît donc que l'hétérogénéité des anticorps pourrait être due, dans une certaine mesure tout au moins, à la nature même du matériel expérimental.

L'hétérogénéité très marquée des populations d'anticorps dont la cause peut faire l'objet de diverses interprétations, apparaît comme un fait d'autant plus significatif que l'homogénéité des propriétés d'affinité spécifique de certaines populations des protéines peut être clairement démontrée. L'un des cas les plus frap-

pants à cet égard est celui des isohémagglutinines normales dont l'homogénéité, à l'intérieur d'une classe génotypique, a été mise en évidence par les travaux de Filitti-Wurmser et Wurmser (1949-1957) [30]. Il faut mentionner également le cas de la β -galactosidase dont l'homogénéité à l'égard de divers analogues non métabolisables du substrat a été démontrée par dialyse à l'équilibre (Cohn, 1957) [31]. Par extension on doit faire l'observation que la majorité des systèmes enzymatiques étudiés dans des conditions adéquates obéissent de façon satisfaisante à la loi de Henri-Michaelis, alors qu'une hétérogénéité marquée de la population de molécules, en ce qui concerne l'affinité spécifique, devrait se traduire par une déviation par rapport à cette loi.

La seconde observation essentielle a trait à la stricte complémentarité structurale existant entre haptènes et anticorps. Si minimes que soient les différences structurales entre deux haptènes, les antisérum obtenus en réponse à ces haptènes sont toujours différents ; l'affinité des antisérum est toujours plus élevée pour l'haptène utilisé pour l'immunisation que pour tout autre analogue structural. Cette conclusion s'applique non seulement à la population d'anticorps dans son ensemble, mais aussi à la fraction de la population qui réagit préférentiellement avec l'analogue envisagé. Ceci peut être démontré par la méthode d'inhibition que nous avons décrite, mettant en œuvre des concentrations extrêmement faibles d'un haptène radioactif. Si l'haptène radioactif est un analogue structural de l'haptène homologue, il se combinera préférentiellement avec les anticorps pour lesquels il présente la plus forte affinité. Si l'on ajoute à ce système des concentrations croissantes de l'haptène homologue et de l'haptène hétérologue non radioactifs, on observe que l'haptène homologue est, à toute concentration, plus efficace que l'haptène hétérologue pour déplacer l'haptène radioactif de sa combinaison avec les anticorps. Ainsi même ceux des anticorps qui ont l'affinité la plus élevée pour l'haptène hétérologue ont une configuration structurale mieux adaptée à l'haptène homologue. L'absence d'anticorps ayant plus d'affinité pour un haptène hétérologue que pour l'haptène homologue ne peut toutefois être affirmée qu'en tenant compte des limites de sensibilité des méthodes utilisées. Cette restriction est inhérente à tout résultat négatif.

La notion d'une stricte complémentarité structurale entre antigène et anticorps, déjà largement acceptée avant les travaux de Landsteiner a été considérée à la suite de ses travaux sur les haptènes comme une des données essentielles de l'Immunologie. La signification de cette conclusion ne saurait être sous-estimée : elle fait apparaître l'immunogénèse comme un phénomène unique, sans analogie avec les autres phénomènes biologiques au cours desquels des modifications du milieu déclenchent la synthèse par

les cellules de macromolécules spécifiques. Notons par exemple qu'un enzyme inductible synthétisé en réponse à différents analogues structuraux du substrat de l'enzyme a toujours les mêmes propriétés, quel que soit l'inducteur utilisé. L'affinité de l'enzyme pour certains analogues peut être très supérieure à l'affinité manifestée à l'égard du substrat naturel de cet enzyme (Monod) [32].

Les études effectuées grâce au système haptène-antihaptène ont apporté des résultats très précis quant au nombre de sites spécifiques présents sur les molécules d'anticorps et à leurs dimensions.

C'est avec une étonnante précision (± 5 p. 100) que la valence des anticorps a été montrée égale à deux (Karush) [7]. Cependant ces études ont été effectuées avec des anticorps purifiés à la suite d'une réaction de précipitation spécifique ; si ces résultats démontrent que les anticorps, vraisemblablement dans leur majorité, sont bivalents, ils n'excluent pas l'existence d'anticorps monovalents non précipitants.

Pour déterminer la taille des sites spécifiques, Kabat [33] a étudié l'inhibition de la précipitation du système anticorps par des polyhexoses de complexité croissante et montré que l'effet inhibiteur croît dans l'ordre suivant : isomaltotriose, isomaltotétraose, isomaltopentaose et isomaltohexaose. Mais déjà pour le tétraose, l'effet inhibiteur est très important et il ne croît que de plus en plus faiblement lorsque la longueur de la chaîne augmente. Les sites se sont révélés hétérogènes quant à leur dimension, variant au moins de celle d'un triose à celle d'un hexaose, la proportion de ces différents sites étant variable d'un individu à un autre.

Utilisant comme haptène le D-phényl(*p*-(*p*-diméthyl-amino-benzène-azo)benzoylamino)acétate, Karush [7] a montré que cet haptène avait sensiblement la taille du site spécifique de l'anticorps puisque le fragment D-phényl(*p*-azo-benzoyl-amino)acétate de cet haptène se combine à l'anticorps avec une énergie de liaison presque égale à celle de l'haptène complet. La correspondance entre ces deux résultats est donc très remarquable. Aucun travail cependant ne permet de préciser si la taille des sites spécifiques doit être considérée comme constante ou bien si elle est sujette à des variations au cours du processus d'immunisation.

Les études sur les anticorps antihaptènes ont été faites très généralement avec des anticorps obtenus à la suite d'une hyperimmunisation et nous ne possédons actuellement que très peu de données sur l'évolution d'affinité des anticorps en cours d'immunisation. Nos travaux récents sur la réaction de rappel [41] traduisent l'existence de variations qualitatives de la population

d'anticorps en cours d'immunisation. Les globulines prélevées avant et cinq jours après l'injection de rappel présentent cependant, dans les conditions de nos expériences, la même affinité pour l'haptène homologue (tyrosine azo-acide benzène para-sulfonique) ; seule la quantité d'anticorps s'est accrue. Mais si l'on ajuste les concentrations des deux préparations de globulines de façon qu'elles soient identiques dans leurs propriétés envers l'azotyrosine homologue, on observe que la réactivité envers une azotyrosine hétérologue (groupement sulfonique en position métá) et envers l'acide sulfanilique a subi un accroissement relatif au cours de la réaction de rappel. La première constatation traduit dans les termes de nos expériences une observation souvent faite à propos de sérum antiprotéines : celle de l'« élargissement » de la spécificité des antisérum à la suite d'injections répétées d'un même antigène. Mais l'acide sulfanilique vis-à-vis duquel la réactivité se trouve également accrue n'est pas un haptène hétérologue mais une partie du motif immunogène. Notre observation suggère que certains fragments du site antigénique pourraient jouer un rôle de plus en plus important en cours d'immunisation dans la détermination de la spécificité des anticorps. Nos résultats montrent seulement la possibilité d'aborder directement, par la technique de dialyse à l'équilibre, un tel problème. Notons que des études très récentes des réactions croisées entre les polyosides de certaines *Salmonella* ont montré qu'au cours de l'immunisation apparaissent des anticorps étroitement spécifiques du sucre terminal. Ces anticorps ne sont pas détectables dans les sérum de lapins immunisés pendant une période courte (Staub, Tinelli, Lüderitz et Westphal, 1959) [34].

Le principal objectif de notre travail sur la réaction de rappel a été de caractériser l'évolution de spécificité des anticorps obtenus à la suite d'injections successives de protéines liées à des haptènes de structure voisine (rappel hétérologue). La nature de la réponse expérimentale à la question ainsi posée revêt une importance critique quant au mécanisme d'action de l'antigène : dans quelle mesure l'évolution quantitative et qualitative de la population d'anticorps déclenchée par l'injection de rappel est-elle influencée par la nature particulière de l'antigène actuellement injecté ? L'antigène injecté lors du rappel fournit-il une matrice qui imprime sa spécificité aux nouvelles globulines synthétisées ou bien déclenche-t-il l'expression d'une information structurale acquise au contact du premier antigène injecté ? Ou encore, agit-il en favorisant sélectivement la synthèse des types d'anticorps qui, formés en réponse au premier antigène injecté, auraient une configuration particulièrement adaptée à ce nouvel antigène ? L'existence de résultats contradictoires (Davenport, Hennessy et collaborateurs, 1953-1956 ; Dixon et Maurer, 1955 ; Dubert,

1956) [35, 36, 37] sur l'effet d'immunisations poursuivies avec des antigènes présentant entre eux des réactions croisées nous a incité à reprendre l'étude de ce problème dans le cas de systèmes haptènes-anticorps antihaptènes : une connaissance précise des éléments de structure antigénique successivement en cause nous paraissait indispensable pour interpréter sans ambiguïté le résultat d'expériences réalisées selon un tel schéma. Les résultats obtenus peuvent être ainsi résumés : au cours du rappel hétérologue, les anticorps formés sont, dans leur majorité, mieux adaptés au premier motif hapténique injecté qu'à celui secondairement injecté ; cependant le nouveau motif hapténique introduit dans l'organisme entraîne l'apparition, également dans les délais de la réaction de rappel, mais en moins grande quantité, d'anticorps qui présentent une affinité plus élevée pour ce motif que pour l'haptène utilisé dans la première phase de l'immunisation. Ce composant mineur de la population d'anticorps obtenu dans ces conditions d'immunisation a été détecté par la méthode d'inhibition, en mettant en œuvre des concentrations extrêmement faibles de l'haptène radioactif correspondant au deuxième antigène injecté. Rappelons qu'une injection d'azoprotéine à un animal non immunisé au préalable n'entraîne l'apparition d'aucun anticorps antihaptène détectable, même dans les délais plus longs de la réponse primaire, et qu'en l'absence d'adjuvant, plusieurs injections répétées sont nécessaires pour que ces anticorps puissent être mis en évidence. Cette situation est complètement modifiée lorsque l'animal a été soumis à une immunisation avec un antigène de structure voisine : le premier contact avec l'antigène déclenche alors, outre une production accrue des types d'anticorps précédemment synthétisés, la formation rapide d'anticorps qui sont spécifiques de ce nouvel antigène.

Dans notre thèse nous avons confronté ces résultats avec les hypothèses faites sur le mode d'action de l'antigène. Si les faits que nous avons décrits devaient être confirmés et généralisés, il apparaîtrait qu'aucune des théories existantes ne peut rendre compte simultanément, dans leur forme actuelle, de la stricte complémentarité structurale entre anticorps et antigène et de la nature de la réponse déclenchée par une injection de rappel hétérologue.

En 1900, Erlich [39] avait supposé que toutes les configurations spécifiques préexistaient dans l'organisme et que l'antigène avait seulement pour rôle de favoriser sélectivement la synthèse des protéines ayant pour ces motifs une certaine affinité. Cette théorie a cependant été abandonnée lorsque la diversité des anticorps qu'un individu est susceptible de synthétiser a paru pratiquement infinie, à la suite, essentiellement, des travaux de Landsteiner sur les haplotypes, et aux théories sélectives se sont substituées des

théories « informatrices », c'est-à-dire des théories qui supposent l'apport par l'antigène d'une nouvelle information structurale dans l'organisme. De nombreuses tentatives sont faites actuellement pour expliquer le phénomène immunitaire selon des théories « sélectives » (Jerne, 1955 [25]; Talmage, 1957 [38], 1959 [40]; Burnet, 1957 [41], 1958 [42], 1959 [43]); la rigoureuse complémentarité structurale des anticorps pour les haptènes demeure l'élément majeur de contradiction.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LANDSTEINER (K.). *The specificity of serological reactions*. Harvard Univ. Press, 1945.
- [2] PAULING (L.), PRESSMAN (D.) et GROSSBERG (A. L.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 784-792.
- [3] MARRACK (J.) et SMITH (F. C.). *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 394-402.
- [4] HAUROWITZ (F.) et BREINL (F.). *Z. physiol. Chemie*, 1933, **214**, 111-120.
- [5] EISEN (H. N.) et KARUSH (F.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 363-364.
- [6] CARSTEN (M. E.) et EISEN (H. N.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 1273-1277.
- [7] KARUSH (F.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 5519-5526.
- [8] KARUSH (F.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 3380.
- [9] NISONOFF (A.) et PRESSMAN (D.). *J. Immunol.*, 1958, **80**, 417-428.
- [10] NISONOFF (A.) et PRESSMAN (D.). *J. Immunol.*, 1958, **81**, 126.
- [11] DUBERT (J. M.). *Thèse de Sciences*, Paris, 1959, Editions Chiron.
- [12] SCATCHARD (G.). *Annals New York Acad. Sci.*, 1949, **51**, 660-673.
- [13] EISEN (H. N.), CARSTEN (M. E.) et BELMAN (S.). *J. Immunol.*, 1954, **73**, 298-308.
- [14] DOTY (P.) et EPSTEIN (S. I.). *Nature*, 1954, **174**, 89-90.
- [15] CANN (J. F.). *The separation and purification of antibodies in Immunity and virus infection*, par V. A. Najjar. John Wiley and sons New York, édit., 100-138.
- [16] HAUROWITZ (F.), TEKMAN (Sh.), BILEN (M.) et SCHWERIN (P.). *Biochem., J.*, 1947, **41**, 305.
- [17] CAMPBELL (D. H.), BLAKER (R. M.) et PARDEE (A. B.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 2496.
- [18] EPSTEIN (S. I.), DOTY (P.) et BOYD (W. C.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 3306.
- [19] LANDSTEINER (K.) et VAN DER SCHEER. *J. exp. Med.*, 1936, **63**, 325-339.
- [20] LERMAN (L. S.). *Thèse de Sciences*. California Institute of Technology, Pasadena, 1949.
- [21] CAMPBELL (D. H.), LUESCHER (E.) et LERMAN (L. S.). *Proc. U. S. Nat. Acad. Sci.*, 1951, **37**, 575-578.
- [22] LERMAN (L. S.). *Nature*, 1953, **172**, 635-636.
- [23] LOISELEUR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, **78**, 1-64 et 151-176.
- [24] TALMAGE (D. W.). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1957, **50**, suppl. 1, 223-246.
- [25] JERNE (N. K.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1955, **41**, 849-857.

- [26] PAULING (L.). *The duplication of molecules*, in *Aspects of synthesis and order in growth*, par D. Rudnick, Princeton Univ. Press, 1954, 3-13.
- [27] SINGER (S. J.) et CAMPBELL (D. H.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 4851-4855.
- [28] FARR (R. S.). *Fed. Proc.*, 1956, **15**, 586.
- [29] BOYD (W.) et HOOKER (S.). *J. biol. Chem.*, 1934, **104**, 329.
- [30] WURMSER (R.). *Expos. Ann. Biochim. Méd.*, 1957, 141-170. (Revue générale où sont résumés les travaux de Wurmser, Filitti-Wurmser et leurs collaborateurs sur les isohémagglutinines.)
- [31] COHN (M.). *Bact. Rev.*, 1957, **21**, 140-168.
- [32] MONOD (J.). *Antibodies and induced enzymes*, in *Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states*, par H. S. Lawrence, Paul B. Hoeber, édit., New York, 1958.
- [33] KABAT (E. A.). *J. Immunol.*, 1956, **77**, 377.
- [34] STAUB (A. M.), TINELLI (R.), LÜDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 303.
- [35] DAVENPORT (F. M.), HENNESY (A. V.) et FRANCIS (Th. Jr.). *J. exp. Med.*, 1953, **98**, 641-655.
- [36] DIXON (F. J.) et MAURER (P. H.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 418-431.
- [37] DUBERT (J. M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **243**, 1939-1941.
- [38] TALMAGE (D. W.). *Ann. Rev. Med.*, 1957, **8**, 239-256.
- [39] ERLICH (P.). *Proc. Roy. Soc. S. B.*, 1900, **66**, 424-448 (*Croonian Lecture*).
- [40] TALMAGE (D. W.). *Science (sous presse)*.
- [41] BURNET (F. M.). *Austr. J. Science*, 1957, **20**, 67.
- [42] BURNET (F. M.). *The theories of antibody production in Immunity and virus infection*, par V. A. Najjar. John Wiley and sons, New-York, 1958, 1-17.
- [43] BURNET (F. M.). *The clonal selection of acquired immunity*, Vanderbilt University Press, Nashville, 1959.

LA TOXINE DIPHTÉRIQUE

par E. H. RELYVELD et S. BEN EFRAIM

(avec la collaboration technique de M^{les} O. BEPOLDIN et A. COUZINET).

(Service de Biochimie Bactérienne [professeur M. RAYNAUD],
Institut Pasteur, Annexe de Garches (S.-et-O.).

INTRODUCTION.

En 1883, Klebs [59] nota la présence d'un bâtonnet dans les coupes des fausses membranes de diphtérie. L'année suivante, Loeffler [68] isola et cultiva le bacille diphtérique par ensemencement à partir des membranes sur du sérum coagulé et réussit à les reproduire chez le pigeon et la poule.

Le germe fut retrouvé dans la gorge de tous les sujets atteints de cette maladie.

La question du pouvoir pathogène de cette bactérie qu'on retrouvait uniquement au point d'inoculation, se posait tout de suite. Loeffler émit l'hypothèse qu'il devait y avoir sécrétion d'un poison, mais n'arriva pas à isoler la toxine.

Ce furent Roux et Yersin qui, en 1888 [132], démontrèrent l'existence de la toxine.

Les filtrats de culture de la bactérie, injectés aux animaux, sont toxiques, et provoquent la paralysie et les mêmes lésions que celles produites par les germes vivants.

C'est aussi la première fois que l'existence d'une toxine bactérienne fut démontrée.

En 1890, von Behring et Kitasato [44, 42] découvrirent l'antitoxine diphtérique. Ils arrivèrent à vacciner des cobayes et montrèrent que le sang des animaux immunisés contient une substance capable de neutraliser spécifiquement la toxine. Cette découverte a ouvert la voie à l'application pratique de la sérothérapie.

L'antitoxine diphtérique employée dans un but thérapeutique ou prophylactique assure une protection de durée très limitée ; peu de temps après l'injection, les anticorps sont détruits.

L'immunité durable est seulement obtenue après contact de l'organisme avec la toxine ou un dérivé atoxique ayant gardé son pouvoir antigénique.

Dans un premier temps, on injecta aux animaux destinés à la production d'antisérum, des doses d'abord faibles de toxine ; les quantités étaient ensuite augmentées.

Le procédé était très délicat, les doses pouvaient être facilement dépassées, ce qui entraînait la mort de l'animal.

Diverses techniques ont été essayées pour transformer la toxine en dérivé atoxique et vaccinant ; on employa, entre autres, des moyens chimiques, l'action de la lumière, de la chaleur, etc.

Smith [138, 139] hyperimmunisa des chevaux avec des mélanges presque neutres de toxine et d'antitoxine, et von Behring [43] fut le premier à vacciner l'homme avec des mélanges neutres.

Cette technique assurant une immunité durable a ensuite été employée par d'autres auteurs [102, 103, 104], mais se montra être trop dangereuse et dut être abandonnée.

Le complexe toxine--antitoxine peut, dans certaines conditions, se dissocier et le mélange devient toxique.

C'est ainsi qu'en Autriche, en 1926, plusieurs enfants meurent à la suite d'une vaccination antidiptérique [45].

L'action simultanée du formol et de la chaleur sur la toxine a permis d'obtenir un dérivé atoxique et stable muni d'un pouvoir immunisant de grande efficacité.

Déjà en 1898, Salkowski [134] signala l'action du formol sur la toxine diptérique, la transformant en un produit atoxique et immunisant.

Des études systématiques de l'action du formol sur les toxines ont été faites par plusieurs auteurs [69, 34].

Bien que divers résultats sur l'immunisation des chevaux ainsi que sur la vaccination de l'homme fussent publiés, on dut admettre que le procédé n'était pas au point [35, 41, 42].

La transformation de la toxine diptérique en dérivé atoxique mais gardant son pouvoir immunisant, sous l'influence simultanée du formol et de la chaleur dans des conditions bien déterminées, a été mise au point par Ramon en 1923 [115, 116].

C'est à partir de ce moment seulement que le problème de la vaccination trouva sa solution définitive et entra dans le domaine pratique.

Le même auteur décrivit aussi le phénomène de la flocculation, application pratique de la réaction de précipitation au titrage *in vitro* des toxines [114] et anatoxines, ainsi que le principe des substances adjuvantes et stimulantes, technique permettant d'augmenter la formation des anticorps [117, 118].

LA PRODUCTION DE LA TOXINE DIPTÉRIQUE.

Les premiers milieux employés pour la production de la toxine diptérique étaient tous à base de peptone et d'extrait de viande.

Divers types de milieux ont été décrits ; certains sont encore employés de nos jours pour la production de toxine destinée à la préparation du vaccin.

Nous citons comme exemple le milieu de Martin [74], modifié par Loiseau et Philippe [70, 71] et d'autres auteurs [119, 53, 8, 2, 15, 16, 14, 120, 114, 143] ainsi que les milieux de Wadsworth et Wheeler [148].

La préparation de ces types de milieux est assez fastidieuse, les rendements de toxines montrent souvent des fluctuations d'une préparation à l'autre.

Il va de soi que l'on a essayé de remplacer ces milieux de composition complexe par des milieux plus simples ; de déterminer les facteurs de croissance et les sources d'énergie ainsi que les conditions de culture, dans l'espoir de pouvoir mettre au point un milieu chimiquement défini.

La production de la toxine sur un milieu synthétique devait permettre d'une part d'obtenir une production régulière de toxine et d'autre part l'étude biochimique et physiologique de la toxinogénèse et le métabolisme du bacille diphtérique. Une voie à la purification de la toxine, tâche difficilement réalisable à partir des milieux complexes, serait ainsi ouverte.

Une observation très importante fut celle de Locke et Main [67], qui notèrent en 1931 qu'une concentration trop élevée en fer diminue la production de toxine. Pope montra ensuite [109] que l'addition de 2 000 µg de fer par litre de milieu de culture inhibe la formation de toxine.

Le rôle du fer a fait l'objet de plusieurs études et leurs résultats ont joué un rôle déterminant dans la mise au point des milieux semi-synthétiques et synthétiques.

Il fut démontré que l'optimum de toxinogénèse se trouve à environ 146 µg de fer par litre de milieu ; si on dépasse cette valeur, le rendement de toxine tombe rapidement [94].

Suivant l'hypothèse de Pappenheimer et Hendee [97, 98], il y aurait formation de l'enzyme respiratoire, le cytochrome b₁, à partir d'une molécule de toxine, quatre molécules de porphyrine et quatre atomes de fer. Cette réaction n'a pas lieu en cas de carence en fer et la toxine et la porphyrine sont sécrétées dans le milieu de culture.

L'action de la toxine sur le développement du ver à soie *Platysamia cecropia* [100], montre qu'une préparation purifiée injectée à la dose de 1 µg provoque la mort de l'adulte et de la larve ; par contre, injectée à la dose de 100 µg, la pupe survit pendant plusieurs jours et jusqu'à deux semaines.

L'inhibition du cytochrome de la larve et de l'adulte n'a pas lieu chez la pupe où les systèmes succinoxidasiques et des cytochromes b et c ont quasi disparu.

L'hypothèse de Pappenheimer est critiquable à plusieurs points de vue ; il n'a pas été possible de préparer de la toxine à partir de l'enzyme ou l'enzyme à partir de la toxine, il n'y a pas de

relation sérologique entre la toxine et le cytochrome. Les porphyrines sécrétées par le germe sont pour 96 p. 100 de la coproporphyrine III [46], et non pas l'hématoporphyrine comme Pappenheimer [97] l'a suggéré.

Le métabolisme du fer chez le bacille diphtérique et sa répercussion sur la toxinogénèse, la porphyrinogénèse et la production de divers enzymes respiratoires a été étudié en détail par Alouf [3].

Il a été démontré que :

1° Toutes les formes ioniques (Fe^{++} , Fe^{+++}) et complexes (ferro- et ferricyanurées) provoquent l'inhibition classique de la toxinogénèse au-delà d'un certain optimum (1). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Yoneda [154], affirmant que seul le fer ionique bivalent est inhibiteur. Le cobalt, par contre, ne peut pas remplacer l'action du fer dans la toxinogénèse, mais peut inhiber la formation de la toxine à l'optimum de fer.

2° L'action du fer est sans influence sur la phase de croissance ralentie ; l'optimum de fer pour la croissance maximum se trouve à 500 μg par litre et ne varie plus jusqu'à 5 000 μg .

3° L'emploi du ^{59}Fe a montré définitivement que le fer est présent jusqu'à 50 p. 100 sous une forme non-hémique dans la bactérie, ceci au-delà de l'optimum de fer.

Ce résultat n'est pas en accord avec l'hypothèse de Pappenheimer admettant que tout le fer bactérien est complexé sous forme hémique.

Quelle est la relation entre la toxinogenèse et la concentration en fer dans les diphtéries cliniques ? Les muqueuses du pharynx ont une concentration en fer au-dessus de l'optimum.

Mueller [82] considère que la différence de tolérance en fer parmi les souches joue un rôle dans la pathogénie de la maladie. Des souches isolées à partir des diphtéries bénignes sont peu toxiques au-dessus de l'optimum de fer ; dans les cas graves, il y aurait formation de la toxine bien au-delà de l'optimum. Mueller [81] a cependant montré qu'au-dessus de l'optimum de toxinogénèse, la formation de toxine est inhibée, mais ne devient pas nulle, même pour des concentrations très élevées en fer ; au-delà de 2 000 μg par litre, il y a encore formation de faibles quantités de toxine. La toxine diphtérique est environ dix fois plus toxique pour l'homme que pour le cobaye et de très faibles quantités de toxine peuvent donc être mortelles.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES ET SEMI-SYNTHÉTIQUES POUR LA PRODUCTION DE LA TOXINE. — En 1935, Mueller [78] décrivit un milieu à base d'extrait de foie, d'acides aminés et de sels.

(1) Le fer hémique semble être sans action selon Pappenheimer, ou possède une action limitée d'après Clarke [20 bis].

Pappenheimer et coll. [96] ont montré qu'on peut remplacer l'extrait de foie par la β -alanine, l'acide pimélique et l'acide nicotinique et que l'hydrolysat de gélatine peut remplacer les acides aminés.

Divers milieux à base d'hydrolysat ont ensuite été définis. Ces milieux sont souvent employés pour la production commerciale de l'anatoxine diphtérique [79, 80, 86, 55, 62, 121].

Drew et Mueller [28], mirent au point, en 1951, un milieu entièrement synthétique, et la même année Yoneda isola des mutants de la souche Toronto qui produisent de la toxine sur des milieux très simples [155, 156].

Un mutant analogue poussant sur un milieu ne contenant que 3 acides aminés et permettant d'obtenir régulièrement 50 Lf/ml, a été isolé par Raynaud et Alouf [3, 124 bis].

La production de la toxine par culture agitée et aérée en fermenteur, a été étudiée et mise au point par Linggood [64, 65].

Ce procédé a plusieurs avantages, la production se fait rapidement sur une grande échelle.

Un fermenteur de 50 l permet d'obtenir un taux de 250 à 300 unités de flocculation par millilitre en quarante-huit heures. La pureté de la toxine est élevée, de l'ordre de 1 500 UF/mg N.

Il nous semble que cette technique de production de toxine est, de toutes celles qui ont été décrites, la plus avantageuse, non seulement pour la fabrication des anatoxines, mais aussi pour la production de grandes quantités de toxine destinées à être purifiées et à servir à des recherches.

La relation entre la croissance et la toxinogénèse diphtériques en milieu agité sur milieu complexe, synthétique et semi-synthétique, a été étudiée par Raynaud et ses collaborateurs [123].

Il a été montré que la toxine est excrétée pendant la phase exponentielle de croissance. La concentration endocellulaire de la toxine reste toujours très faible, la toxine n'est pas libérée dans le milieu par autolyse des germes.

Une contribution à l'étude de la croissance du bacille diphtérique en fonction de divers facteurs sur des milieux variés a été apportée par Mangalo [73].

POUVOIR PATHOGÈNE DES DIVERS TYPES DE *Corynebacterium diphtheriae*.

Suivant l'aspect des colonies de *C. diphtheriae* sur gélose au sang tellurite de potassium et selon leurs caractères biochimiques, on distingue trois types : *gravis*, *mitis* et *intermedius*.

Le rapport entre la gravité de leur pouvoir pathogène ainsi que leur fréquence dans les épidémies a été étudié à plusieurs occasions.

Certains auteurs [6, 7, 25, 140] ont constaté une prédominance du type *gravis* pendant une épidémie et noté que ces infections réagissent beaucoup moins favorablement à l'antitoxine que les infections dues aux types *mitis* et *intermedius*; ce sont les diphthèries graves.

Contrairement à ces faits, d'autres auteurs trouvent une prédominance du type *mitis* [26, 76, 77] ou *intermedius* [83], ou ne trouvent pas de relation entre la colonie isolée et la gravité de la maladie [75, 101, 142, 145, 153].

On peut conclure que chacun des trois types peut préexister durant une épidémie et qu'il y a une différence de virulence entre les souches.

Certaines souches sont, de même, incapables de produire de la toxine; inoculées à l'animal, elles n'entraînent pas la mort, mais une nécrose à l'endroit de l'injection [36, 57, 89]. Cette nécrose aurait pour cause une endotoxine différente de la toxine sécrétée dans le milieu de culture (exotoxine); elle est létale par voie intracérébrale et n'est pas neutralisée par l'antitoxine [39].

Les souches avirulentes sont en général peu pathogènes et ne provoquent pas d'épidémies [33, 122].

RÔLE DES PHAGES DANS LA TOXINOGENÈSE.

Les souches de *C. diphtheriae* dite « avirulentes » et possédant tous les caractères morphologiques biochimiques et culturels, sauf le pouvoir de produire la toxine, ont été, comme nous venons de le voir à l'origine de nombreuses controverses, d'autant plus qu'elles appartenaient aux trois types (*gravis*, *mitis* et *intermedius*).

Une souche toxigène peut progressivement perdre cette capacité; ce fait est bien connu et a été étudié à plusieurs reprises.

Amiens [4] a fait la sélection par rapport au pouvoir toxigène et a isolé à partir de la souche C N 77 diverses variantes dont une atoxigène.

D'autres auteurs, partant d'un clone toxigène, isolèrent des souches avirulentes [22, 23].

La transformation d'une souche atoxique en souche toxigène a été réalisée par Freeman [37] par l'action d'un phage libéré par une souche virulente.

Le phage détruit une partie des bactéries, mais celles qui résistent sont devenues à la fois toxigènes et lysogènes.

La toxine ne diffère pas, dans ses caractères biochimiques et immunologiques, de celle sécrétée par les souches virulentes.

Des souches avirulentes de type *gravis*, *mitis* et *intermedius* deviennent toutes trois virulentes par l'action du phage [38].

Les résultats de Freeman ont été confirmés par plusieurs autres auteurs [48, 49, 50, 54, 105] et Parsons [106] a même pu obtenir cette transformation à partir d'un phage isolé d'une souche non virulente.

Groman [51] a montré que l'apparition des caractères toxinogènes n'est pas due à une sélection de mutants préexistants avant contact avec le phage. Il n'y a pas non plus de relation immunologique entre le phage et la toxine.

Toute lysogénisation n'est pas suivie d'une transformation de bactérie atoxigène en bactérie toxigène, mais se fait uniquement sous l'influence d'un phage spécifique. Des infections réductives mais non toxigènes ont été décrites, mais l'activation nécessite toujours une lysogénie [9, 47, 56].

D'après Hartmann [52], la transformation n'est pas une transduction (transmission de matériel génétique et de caractères héréditaires d'une bactérie à une autre) ; le pouvoir transformant est une propriété possédée par chaque particule phagique et ne dépendant pas de la bactérie ayant transmis le prophage ; l'auteur propose le nom de conversion pour ce type particulier de transformation.

Le rôle du phage dans la toxinogenèse de *C. diphtheriae* est donc établi, mais le mécanisme exact du phénomène reste toujours à élucider, malgré les précisions apportées par Barksdale [10].

EXISTE-T-IL UNE SEULE OU PLUSIEURS TOXINES DIPHTÉRIQUES ?

L'antitoxine diptérique préparée à partir d'une anatoxine pure (voir plus loin) neutralise la toxine brute. Ces types d'antitoxines contiennent souvent, au début de l'hyperimmunisation, uniquement des anticorps antitoxiques décelables par les tests de diffusion en gélose [129] ; après hyperimmunisation prolongée, il y a formation d'anticorps accessoires vis-à-vis des traces d'impuretés présentes dans les préparations pures.

L'antitoxine préparée à partir de la souche P. W. 8 neutralise les filtrats de culture des divers types de *C. diphtheriae* [29].

Il y a donc *a priori*, de toute évidence, un seul constituant toxique, contrairement à ce que l'on observe dans le cas de cultures d'autres germes, par exemple Clostridies de la gangrène gazeuse, staphylocoque, etc.

La présence de toxines autres que la toxine classique a cependant été signalée par certains auteurs : O'Meara [90] trouve à côté de cette toxine (toxine-A) un autre facteur toxique qu'il appelle facteur-B, libéré surtout par les souches *gravis*.

La souche P. W. 8 n'est pas très virulente et contient la toxine-A.

Les sérum avides contiendraient des anticorps anti-B en concentration élevée, la qualité d'un sérum dépendrait, d'après ces auteurs, du rapport anticorps anti-B/antitoxine anti-A.

Niggemeyer [84, 85] a isolé quatre constituants toxiques : la toxine classique (toxine-A de O'Meara), une toxine dermonécrotique, l'endotoxine de Frobisher et coll. [39], une toxine hémolytique, ainsi que le facteur de diffusion de Duran-Reynals [30] : l'hyaluronidase ; les trois derniers constituaient le facteur-B de O'Meara.

Ces résultats n'ont pas été confirmés par Scheibel [135] qui a trouvé une protection contre des souches *gravis* chez des cobayes immunisés avec la toxine pure seule ou associée à un vaccin antibactérien ou aux protéines-P (protéines de filtrats de culture en excès de fer) [95, 99], tandis que ces derniers à eux seuls n'assurent pas de protection. Les résultats de Scheibel ont été confirmés par Bowen [18] et coll., tandis que Lautrop [60] trouve une protection contre les souches virulentes après immunisation avec une souche non virulente (2).

LA PURIFICATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

La purification de la toxine diphtérique a fait l'objet de nombreuses études.

Des préparations de pureté moyenne ont été obtenues durant les années 1930 à 1940. Eaton [31, 32] fut l'un des premiers à décrire le mode d'obtention d'une toxine titrant 2 000 UF/mg N, à partir d'un milieu à base de peptone.

La mise au point de milieux semi-synthétiques a rendu la purification plus simple et Pappenheimer [95] isola en 1937 une toxine à 2 170 UF/mg N. Des préparations de même pureté ont été obtenues par d'autres auteurs [1, 62, 86, 131].

Pope décrivit en 1951 [111] une toxine de pureté beaucoup plus élevée titrant 3 200 UF/mg N et montra à l'aide de la technique de diffusion en gel que les préparations titrant 2 000 à 2 500 UF/mg N contiennent, à côté de la toxine, encore de nombreux autres antigènes. La toxine pure obtenue sous forme cristallisée [112, 113] donne par cette technique une seule ligne de précipitation spécifique.

Les résultats de Pope ont été confirmés et des préparations de

(2) Branham (S. E.), Hiatt (C. W.), Cooper (A. D.) et Riggs (D. B.) ont récemment (*J. Immunol.*, 1959, 82, 397) trouvé des différences de composition entre les filtrats de culture de la souche Park Williams n° 8 et ceux de certaines souches *gravis*. Ces derniers contiendraient un constituant de constante de sédimentation élevée (40 à 60 S) qui serait responsable de la formation de l'œdème local observé lorsqu'on les injecte par voie intradermique au cobaye.

pureté semblable obtenus par nous [124, 130] et d'autres auteurs [58, 61, 87].

Nous décrirons brièvement la technique de purification que nous employons. Une description plus détaillée a été donnée ailleurs [130].

Le premier pas vers la purification de la toxine comporte la concentration des filtrats de culture. Nous avons décrit en 1954 [127] une technique de précipitation de la toxine brute à l'aide de l'acide métaphosphorique. Cette méthode, bien qu'étant un excellent moyen de concentration de protéines, a été remplacée par l'ultrafiltration, beaucoup moins laborieuse.

L'ultrafiltration [113 bis] est une ancienne technique qui a déjà été employée en 1915 par Brown [19], Glenny et Walpole [40, 150].

Il est possible de préparer des membranes qui laissent passer la toxine et retiennent les protéines de poids moléculaires plus élevé, ou des membranes qui retiennent la toxine et laissent passer certaines impuretés [137, 149].

Nous employons une technique qui a été décrite en détail par van Ramshorst [121] et consiste à tremper des bougies de filtration d'abord dans l'acide acétique cristallisé, ensuite dans une solution de parlodion à 8 p. 100 dans le même acide. Après égouttement, elles sont trempées dans de l'eau distillée et longuement lavées. On peut réunir plusieurs bougies entre elles ; le vide se fait par une trompe à eau. La toxine est retenue par des membranes, le rendement est de 80 à 95 p. 100 (fraction U).

L'ultrafiltration est employée par plusieurs auteurs comme début de la purification de la toxine ou de l'anatoxine, entre autres par Pope [110], Norlin [86], van Ramshorst [121].

D'autres techniques de concentration ont été décrites. Nous citerons la précipitation par abaissement du pH jusqu'au point isoélectrique. Les acides employés sont l'acide trichloracétique [17, 86], l'acide acétique [31, 133], et l'acide chlorhydrique [20, 66, 86]. La précipitation par des solvants neutres a été décrite. Pillemer [61] précipite la toxine par des mélanges de méthanol-eau, dans des conditions bien déterminées de force ionique, de température et de concentration en protéines. Ces techniques ont l'inconvénient d'entraîner souvent une dénaturation de la toxine et sont difficilement applicables à grande échelle.

La toxine une fois concentrée est fractionnée par des sels neutres [21, 27].

Les sels le plus souvent employés pour la purification sont le sulfate d'ammonium et le phosphate de potassium.

Dans la technique que nous avons mise au point, nous faisons dans un premier temps un fractionnement au phosphate, suivi d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium.

On détermine d'abord, suivant Tasman et Brandwyk [141], quelles sont les concentrations à employer, ce qui consiste à ajouter des quantités croissantes de sel à la toxine et à recueillir le maximum de toxine (80 à 95 p. 100) pour des concentrations aussi voisines que possible, en général entre 50 et 75 p. 100 (fraction P_2).

Le précipité recueilli est dissous dans du tampon (phosphate $K/K_2 M/_{15}$ pH = 7 + NaCl 0,172 M) et refractionné par la même technique avec une solution de sulfate d'ammonium saturé et neutre (fraction S_2).

Le fractionnement des préparations concentrées par l'ultrafiltration par le sulfate d'ammonium a été employé avec succès par Pope [143] et Norlin [87].

Lepow et Pillemeyer ont obtenu des préparations de haute pureté par fractionnement avec le sulfate et précipitation par des solvants organiques [61, 108].

Deux techniques nous ont ensuite permis d'obtenir la toxine pure à partir de la fraction S_2 :

1^o Adsorption sélective des impuretés, suivie de la cristallisation fractionnée.

2^o Chromatographie sur phosphate de calcium ou D. E. A. E. cellulose.

La purification par l'adsorption sélective se fait par deux voies. On peut soit adsorber la toxine et ensuite l'éluer, soit adsorber les impuretés et non la toxine.

L'hydroxyde d'aluminium d'après Schmidt [136] a été employé par Pappenheimer, Lepow et Pillemeyer [61], Norlin [86]; le charbon actif par Linggood [63] et Pope [143]. On trouve une littérature détaillée sur ce sujet dans les publications de van Ramshart [421] et de Norlin [86].

Nous avons d'abord employé l'alumine Cy d'après Schmidt [136] dans les conditions de Pappenheimer [95] et ensuite le charbon actif dans les conditions de Pope [143].

La pureté de la toxine n'augmente pas beaucoup par cette manipulation, mais les préparations ainsi obtenues (fraction S_3) sont presque incolores et se prêtent mieux à la dernière étape, la cristallisation (fraction Cr).

On ajoute lentement à la toxine dissoute dans de l'eau distillée et titrant 500 à 1 000 UF/ml une solution de sulfate d'ammonium saturée et neutre jusqu'à ce qu'une légère opalescence se forme. La solution est filtrée après plusieurs heures de repos. On prépare ensuite dans un sac de dialyse la quantité de sulfate d'ammonium nécessaire pour augmenter la concentration de 5 p. 100 et on place ce sac dans la solution de toxine. Après vingt-quatre heures à 0°, le sac est crevé. L'opération est répétée une deuxième fois.

On obtient en général de cette façon des cristaux et du matériel amorphe. Une deuxième ou même une troisième cristallisation permettent d'obtenir la toxine pure cristallisée sans matériel amorphe.

Nous avons obtenu deux types de cristaux : en forme d'obus et en forme d'aiguille [430]. Le tableau I montre les résultats d'une purification telle que nous venons de la décrire.

TABLEAU I.

Fractions	UF / ml	UF/mg N	Rendements	Observations
U	500	194		Toxine ultrafiltrée
P ₂	1000	1150	95 %	Fraction 50-75 %
S ₂	1250	1925	83,5 %	Fraction 45-60 %
S ₃	1125	1990	69,5 %	
Cr I	1000	2350	27,2 %	Fraction 50-55 %
Cr I'	450	2500	20 %	Fraction 55-60 %
Cr II	700	2940	29 %	Fraction 50-60 %
Cr III	750	3000	16,6 %	Fraction 50-56,5 %

Purification de la toxine diphtérique (milieu hydrolysat de caséine-acide glutamique) [427, 430]. Pour la désignation des fractions, voir le texte. Les rendements ont été calculés par rapport à la fraction U. Les deux fractions Cr I et Cr I' ont été réunies ; elles contenaient des cristaux et du matériel amorphe. La fraction Cr II contenait également des cristaux et du matériel amorphe. La fraction Cr III contenait uniquement des cristaux.

On peut aussi obtenir la toxine pure par chromatographie.

Nous avons employé le phosphate de calcium et la DEAE cellulose [107 bis, 137 bis].

La chromatographie sur phosphate de calcium a été mise au point par Tiselius [446]. Le gel est obtenu par précipitation d'une solution de chlorure de calcium 0,5 M avec une solution de phosphate disodique 0,5 M suivie de plusieurs lavages.

Sur une colonne de 2 cm de diamètre et 20 cm de hauteur, on adsorbe environ 10 000 UF.

La toxine est d'abord dialysée contre du bicarbonate de soude à 1 p. 1 000 ou du phosphate de potassium K/K₂, pH = 6,8-7, M/100.

Diverses expériences nous ont permis de mettre au point les conditions d'éluion. On fait d'abord passer 150 ml d'une solution de phosphate K/K₂ pH = 6,7-7,0 ; 0,03 M. Ensuite 100 ml de la même solution à 0,04 M.

TABLEAU II.

Fractions	UF / ml	UF/ mg N	Rendements	Observations
U	1440	1500 *	-	
P ₂	900	1680 *	88,5 %	Fraction 50-75 %
S ₂	840	2540	55 %	Fraction 46-56 %
tube 32	108	2540	7,05 %	
tube 33	204	2980	13,4 %	
tube 34	120	3140	7,9 %	

Purification de la toxine diphtérique (milieu hydrolysat de caséine-acide glutamique) [127, 130]. Pour la désignation des fractions, voir le texte. Les rendements ont été calculés par rapport à la fraction U. Les fractions de chromatographie sur phosphate de calcium ont été recueillies en quantités de 10 ml. * UF/mg d'azote protéique.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — U : Toxine brute ultrafiltrée (375 UF/mg N). T : toxine pure cristallisée à 3 100 UF/mg N. S₁ : Sérum digéré (n° 906) contenant de nombreux anticorps accessoires. S₂ : Sérum 1451-D contenant uniquement l'antitoxine antidiphtérique obtenue par digestion du précipité spécifique anatoxine-sérum à l'optimum de flocculation [130]. Toutes les préparations titrent 400 UF/ml dans chaque cuve. Reproduction grandeur nature.

FIG. 2. — Précipitation spécifique en gel. Couche inférieure : sérum brut gélosé (n° 91 contenant de multiples anticorps accessoires) à 100 UF/ml. Couche intermédiaire : gélose sans sérum. La toxine non gélosée a été ajoutée sur la couche intermédiaire ; de gauche à droite : toxine brute ultrafiltrée à 250 UF/ml (375 UF/mg N) ; toxine pure à 250 UF/ml (3200 UF/mg N) ; toxine brute ultrafiltrée à 100 UF/ml et toxine pure à 100 UF/ml. La reproduction photographique présente seulement les couches inférieures

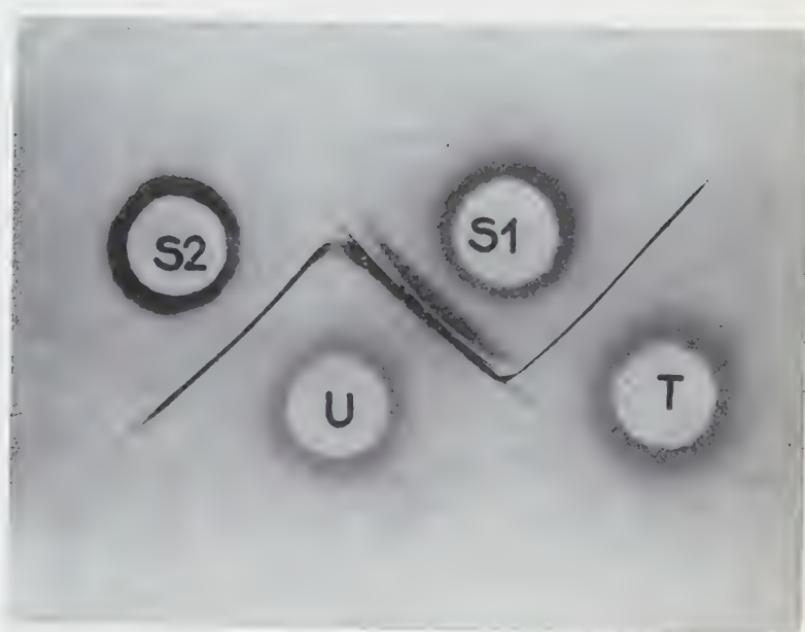


Fig. 1.

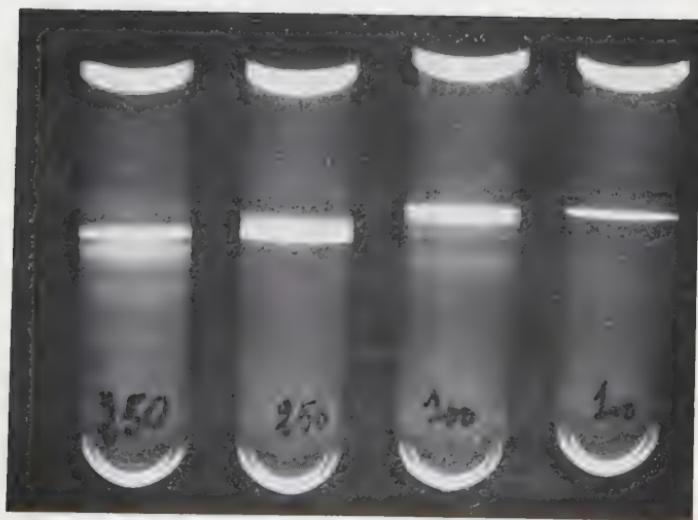


Fig. 2.



La toxine est éluée par une solution de phosphate disodique 0,07 M pH = 8,2.

Le tableau II montre l'exemple d'une purification par chromatographie sur phosphate de calcium et la figure 1 les résultats de trois chromatographies successives de la même préparation de toxine.

La capacité d'adsorption de la DEAE cellulose est très supérieure à celle du phosphate de calcium.

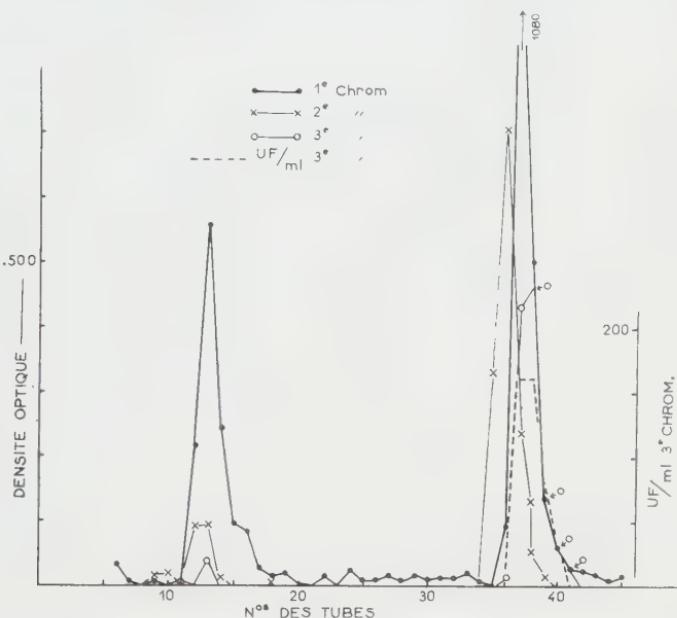


FIG. 1. — Trois chromatographies successives de la même préparation de toxine (6 000 UF) sur phosphate de calcium. Les tubes contenant la toxine (34 à 41) ont été réunis. La toxine a été dialysée et chromatographiée à nouveau. Volume des fractions recueillies : 10 ml. Abscisse, numéro des tubes ; ordonnée, densité optique à 280 m μ . 500 = 0,5. Développement par 150 ml de phosphate monodipotasique 0,03 M (à partir du tube n° 7), suivi de 100 ml 0,04 M et du phosphate disodique 0,07 M.

Sur une colonne de 2,5 cm de diamètre et de 40 cm de hauteur, on peut fractionner jusqu'à 100 000 UF de toxine.

Pour assurer un écoulement rapide des liquides éluants, nous avons mélangé une partie de cellulose DEAE avec une partie de cellulose Whatman. La figure 2 montre le résultat d'une purification d'une toxine préparée sur milieu Loiseau-Philippe.

Il y a peu de temps [127], il nous semblait encore impossible de purifier ces toxines.

APPLICATION DES TECHNIQUES DE DOUBLE DIFFUSION EN GÉLOSE A L'ÉTUDE DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE. — L'application des techniques de double diffusion en gélose selon Oakley-Fulthorpe [88] et Ouchterlony [91, 92, 93] nous a renseignés sur le nombre de systèmes précipitants présents dans les toxines au cours de la purification.

Nous avons employé pour démontrer la complexité de la toxine deux types de sérum antidiptériques :

1° Un sérum commercial digéré ; ce sérum (n° 906) est un

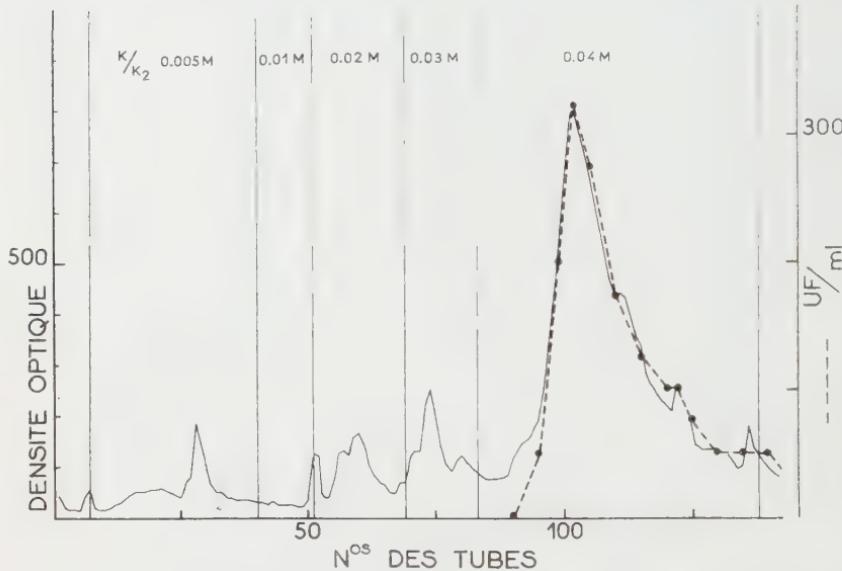


FIG. 2. — DEAE Cellulose (Brown et Co) 10 g + 10 g de cellulose Whatman. Colonne de 22 × 700 mm. Adsorption de 100 000 UF de toxine (pureté, 1 390 UF/mg N) en solution dans $\text{PO}_4\text{KH}_2/\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ 0,005 M, pH = 6,8. Développement par $\text{PO}_4\text{KH}_2/\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ (pH = 6,8) 0,005, 0,010, 0,020, 0,030, 0,040 et 0,050 M. Le volume des fractions recueillies est de 10 ml. Courbe en trait plein : densité optique à 280 m μ . 500 = 0,5. Courbe en pointillé : concentration de toxine dans chaque tube en unités UF/ml. La toxine recueillie dans les tubes 95 jusqu'à 135 titre 3 000 UF/mg N. Rendement, 62 p. 100 (Kf, quinze secondes). La vitesse de percolation est de 60 ml à l'heure. La présence de cellulose inerte accélère le passage à travers la colonne sans modifier le diagramme d'éluion.

mélange de plusieurs saignées de chevaux hyperimmunisés avec l'anatoxine brute et ensuite purifié par digestion pepsique [5].

L'hyperimmunisation des chevaux avec l'anatoxine brute pendant plusieurs mois a provoqué la formation d'anticorps contre toutes les protéines présentes dans ces préparations même à l'état de traces.

2° Nous avons obtenu par digestion du précipité spécifique, formé à l'optimum de flocculation entre la toxine et un sérum contenant peu d'anticorps accessoires, une préparation d'antitoxine contenant uniquement des anticorps antitoxiques. La préparation de ce sérum, le n° 1451-D, a été décrite en détail [130].

Les préparations de toxines brutes concentrées donnent avec le sérum complexe jusqu'à 15 lignes de précipitation spécifique [127], tandis que la toxine pure donne une seule ligne [130].

Des préparations titrant 2 200 à 2 400 UF/mg N donnent encore 6 à 8 lignes si on les teste contre le sérum complexe. Ces résultats sont donc conformes à ceux de Pope [111, 112].

Toutes les préparations de toxine testées contre le sérum 1451-D donnent une seule ligne de précipitation spécifique.

Ce sérum a permis de mettre en évidence la toxine dans les préparations complexes et de suivre la purification de la toxine comme le montre la figure 1 de la planche.

Les résultats montrent que les filtrats de culture de *C. diphtheriae* contiennent, outre la toxine, de nombreux constituants antigéniques (anticorps accessoires), et les sérums des animaux hyperimmunisés avec les préparations non purifiées, des anticorps vis-à-vis de ces antigènes (anticorps accessoires) [voir pl. fig. 2].

L'hyperimmunisation des chevaux avec des toxines purifiées nous a permis d'obtenir des préparations avec un nombre très réduit d'anticorps accessoires. La préparation et les caractères de ces sérums ont été décrits [130, 129].

Nous avons appliqué les techniques de l'électrophorèse en gélose [147] et l'immunoélectrophorèse [43, 44, 151, 152] à l'étude de la toxine.

Les résultats de ces expériences ont déjà été publiés en détail [128] ; nous rappellerons ici seulement les faits principaux observés.

La toxine brute révélée avec un sérum complexe montre la présence de plusieurs antigènes de mobilité distincte. Une seule de ces lignes représente la toxine ; celle-ci peut être mise en évidence à l'aide de la toxine pure.

L'épuisement de la toxine brute avec du sérum à une zone et vice-versa, l'épuisement du sérum complexe avec la toxine pure, supprime seulement une seule ligne de précipitation spécifique correspondant à celle du système toxine-antitoxine.

Ces expériences montrent que la réaction toxine-antitoxine diphtériques renferme un seul système précipitant.

L'électrophorèse en gélose de la toxine pure révèle, après dessiccation et coloration de la plaque, la présence d'un seul constituant [130].

La mobilité électrophorétique de la toxine diptérique correspond à celle d'une α_1 -globuline humaine ; on peut estimer sa

vitesse à $5 \cdot 10^{-5}$ cm 2 volt $^{-1}$ sec $^{-1}$ (conditions de l'électrophorèse tampon véronal $\Gamma/2 = 0,05$, pH = 8,2).

La constante de diffusion calculée par diffusion en gélose d'après Becker et coll. [24] est égale à $6,15 \cdot 10^{-7}$ cm 2 sec. $^{-1}$ [130].

CARACTÈRES DE LA TOXINE. — Lundgren, Pappenheimer et Williams [72] ont déterminé les caractères physiques de leur toxine.

Nous avons déjà vu que les préparations n'étaient pas pures : elles se montraient néanmoins homogènes à l'ultracentrifugation : l'électrophorèse révélait un constituant plus rapide que la toxine de faible concentration. Nous résumons ci-après les valeurs des constantes physiques déterminées :

Constante de sédimentation corrigée = 4,6 S (pH = 6,9 tampon phosphate M/15 + NaCl 0,172 M concentration 1 p. 100).

La constante de diffusion corrigée déterminée dans les mêmes conditions à une concentration de 0,4 p. 100 sur l'appareil d'électrophorèse de Tiselius est égale à $6,2 \times 10^{-7}$ cm 2 sec. $^{-1}$, température 20°.

Le poids moléculaire calculé en employant un volume spécifique égal à 0,75 est de 72 000.

Petermann et Pappenheimer [107] déterminent ensuite la constante de sédimentation à plusieurs concentrations (0,24-1,02 p. 100) en tampon phosphate-borate + 0,172 M NaCl, et trouvent que la valeur est indépendante de la concentration.

La moyenne des constantes de sédimentation déterminées à une concentration de 0,5 p. 100 à des pH compris entre 5,6 et 10,1 (NaCl 0,172 M) est égale à 4,6 S.

Plusieurs déterminations de la constante de diffusion en tampon borate-phosphate + 0,172 M NaCl donnent une moyenne de 6×10^{-7} cm 2 sec. $^{-1}$. Le poids moléculaire déterminé à partir de ces données avec emploi d'un volume spécifique égal à 0,736 est de 74 000.

Nos déterminations de la constante de sédimentation et de diffusion ont donné des valeurs légèrement inférieures à celles trouvées par Pappenheimer et feront l'objet d'une publication ultérieure.

La vitesse électrophorétique est égale à 4,9 cm 2 volts $^{-1}$ sec. $^{-1}$ (pH = 7,35, $\Gamma/2 = 0,100$). Nous avons trouvé par électrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse une valeur du même ordre de grandeur.

Le point isoélectrique est de $4,1 \pm 0,1$ et le coefficient de friction est de 1,25. La molécule de toxine assimilée à un ellipsoïde de révolution donne un rapport de grand axe sur petit axe = 4,7.

Pappenheimer a aussi déterminé la composition chimique de sa

toxine (pourcentage de C, N, H, S, P et certains acides aminés) ; nous nous proposons de refaire ces déterminations sur une toxine pure.

Nous avons démontré l'existence de plusieurs « motifs » antigéniques sur la molécule de toxine. Les résultats de ces expériences ainsi que nos études sur la réaction toxine-antitoxine ont été présentés ailleurs [125, 126, 130].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AGNER (K.). *J. exp. Med.*, 1950, **92**, 337.
- [2] ABT (G.) et LOISEAU (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1922, **36**, 535 ; 1925, **39**, 114.
- [3] ALOUF (J.). *Etude physiologique et biochimique de la toxino-génèse diphtérique*. Thèse Pharmacie, Paris, juillet 1958.
- [4] AMIENS (C. R.). *J. Path. Bact.*, 1948, **60**, 595.
- [5] AMOUREUX (G.) et YEU (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 165.
- [6] ANDERSON (J. S.), HAPPOLD (F. C.), McLEOD (J. W.) et THOMSON (J. C.). *J. Path. Bact.*, 1931, **34**, 667.
- [7] ANDERSON (J. S.), COOPER (K. E.), HAPPOLD (F. C.) et McLEOD (J. W.). *J. Path. Bact.*, 1933, **36**, 169.
- [8] AYERS (S. H.) et RUPP (P.). *J. inf. Dis.*, 1918, **28**, 188.
- [9] BARKSDALE (L.) et PAPPENHEIMER (A. M.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 220.
- [10] BARKSDALE (L.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, X.
- [11] BEHRING (E. von) et KITASATO (S.). *Dtsch. med. Wschr.*, 1890, **16**, 1113.
- [12] BEHRING (E. von). *Dtsch. med. Wschr.*, 1890, **16**, 1145.
- [13] BEHRING (E. von). *Dtsch. med. Wschr.*, 1913, **39**, 873.
- [14] BERTHELOT (A.), RAMON (G.) et AMOUREUX (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 32.
- [15] BERTHELOT (A.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 280.
- [16] BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (G.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **14**, 286.
- [17] BOIVIN (A.) et IZARD (Y.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 25.
- [18] BOWEN (H. E.), WYMAN (L.) et McCOMBE (J. A.). *Am. J. Hyg.*, 1954, **59**, 306.
- [19] BROWN (W.). *Biochem. J.*, 1915, **9**, 591.
- [20] BUNNEY (W. E.), CIANCIARULO (J.) et KIAMIL (M.). *J. Immunol.*, 1931, **20**, 417.
- [20 bis] CLARKE (G. D.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 698.
- [21] COHN (E. J.). *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349.
- [22] COWAN (M. L.). *Brit. J. exp. Path.*, 1927, **8**, 6.
- [23] CROWELL (M. J.). *J. Bact.*, 1926, **11**, 65.
- [24] BECKER (E. L.), MUÑOZ (J.), LAPRESLE (C.) et LE BEAU (L. J.). *J. Immunol.*, 1951, **67**, 501.
- [25] CHRISTISON (M. H.). *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 1934, **133**, 59.
- [26] DAS (A.) et GHOSAL (S. C.). *Lancet*, 1951, **1**, 1410.
- [27] DERRIEN (Y.). *Särtryck ur Svensk Kemisk Tidskrift*, 1947, **59**, 139.

- [28] DREW (R. M.) et MUELLER (J. H.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 549.
- [29] DUMAS (J.). *Bactériologie Médicale*, Edit. Méd. Flammarion, Paris, 1951.
- [30] DURAN-REYNALS (F.). *J. exp. Med.*, 1933, **58**, 161.
- [31] EATON (M. D.). *J. Bact.*, 1936, **31**, 347.
- [32] EATON (M. D.). *J. Bact.*, 1936, **31**, 367.
- [33] EDWARD (D. G.) et ALLISON (V. D.). *J. Hyg.*, 1951, **49**, 205.
- [34] EISLER (M. von) et LOEWENSTEIN (E.). *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1912, **61**, 271.
- [35] EISLER (M. von). *Wien. Klin. Wschr.*, 1915, **28**, 1223.
- [36] FEIERABEND (B.) et SCHUBERT (O.). *Z. Immun. Forsch.*, 1929, **62**, 283.
- [37] FREEMAN (V. J.). *J. Bact.*, 1951, **64**, 675.
- [38] FREEMAN (V. J.) et MORSE (U.). *J. Bact.*, 1952, **63**, 407.
- [39] FROBISHER (M.), PARSONS (E. I.) et UPDYKE (E.). *Am. J. publ. Hlth.*, 1947, **37**, 543.
- [40] GLENNY (A. T.) et WALPOLE (G. S.). *Biochem. J.*, 1915, **9**, 298.
- [41] GLENNY (A. T.) et SUDMERSEN (H. J.). *J. Hyg.*, 1921, **20**, 176.
- [42] GLENNY (A. T.) et HOPKINS (B. E.). *Brit. J. exp. Path.*, 1923, **4**, 283.
- [43] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
- [44] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr.). *Biochim Biophys. Acta*, 1955, **47**, 67.
- [45] GRASSBERGER (R.). *Arch. Hyg.*, 1926, **97**, 97.
- [46] GRAY (C. H.) et HOLT (L. B.). *J. biol. Chem.*, 1947, **169**, 235.
- [47] GROMAN (N. B.) et LOEKART (R. Z.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 178.
- [48] GROMAN (N. B.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 184.
- [49] GROMAN (N. B.). *Science*, 1953, **117**, 297.
- [50] GROMAN (N. B.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 9.
- [51] GROMAN (N. B.) et EATON (M.). *J. Bact.*, 1955, **70**, 637.
- [52] HARTMANN (R. E.). *The chemical basis of heredity*. J. Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 408.
- [53] HAZEN (E. L.) et HELLER (G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1931, **28**, 423.
- [54] HEWITT (L. F.). *J. gen. Microbiol.*, 1954, **11**, 288.
- [55] HOLT (L. B.). *Developments in diphtheria prophylaxis*. W. Heinemann Medical Books, Londres, 1950.
- [56] HOWARD (D. H.) et JANN (G. J.). *J. Bact.*, 1954, **68**, 316.
- [57] IVANIC (S. Z.), DIMITRIJEVIC-SPETH (V.) et JOVANOVIC (L.). *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 1931, **121**, 432.
- [58] KATSURA (T.), KATO (I.), NAKAMURA (H.) et KOYAMA (J.). *Jap. J. Microbiol.*, 1957, **1**, 213.
- [59] KLEBS (E.). *Verh. Congr. inn. Med.*, Wiesbaden, 1883, p. 189.
- [60] LAUTROP (H.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1955, **36**, 274.
- [61] LEPOW (I. H.) et PILLEMER (L.). *J. Immunol.*, 1952, **69**, 1.
- [62] LEVIN (L.), WYMAN (L.) et EDSELL (G.). *J. Immunol.*, 1949, **63**, 219.
- [63] LINGGOOD (F. V.). *Brit. J. exp. Path.*, 1941, **22**, 255.
- [64] LINGGOOD (F. V.). *6th Int. Congr. Microbiol.*, Rome, 1953.
- [65] LINGGOOD (F. V.), MATTHEWS (A. C.), PINFIELD (S.), POPE (C. G.) et SCHARLAND (T. R.). *Nature*, 1955, **176**, 1128.
- [66] LOCKE (A.) et MAIN (E. R.). *J. inf. Dis.*, 1928, **43**, 41.
- [67] LOCKE (A.) et MAIN (E. R.). *J. inf. Dis.*, 1931, **48**, 419.

[68] LOEFFLER (F.). *Mitt. Kaiserl. Gesundh. Amt.*, 1884, **2**, 421.

[69] LOEWENSTEIN (E.). *Z. Hyg.*, 1909, **62**, 491.

[70] LOISEAU (G.) et PHILIPPE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 168, 266 ; 1933, **112**, 426 ; 1934, **117**, 1056.

[71] LOISEAU (G.) et PHILIPPE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 469.

[72] LUNDGREN (H. P.), PAPPENHEIMER (A. M.) et WILLIAMS (J. W.). *J. Am. chem. Soc.*, 1939, **61**, 533.

[73] MANGALO (R.). *Contribution à l'étude de la toxinogénèse diphtérique*. Thèse Pharmacie, Paris, 1957.

[74] MARTIN (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, **12**, 26.

[75] MENTON (J.), COOPER (T. V.), DUKE (F. W.) et FUSSELL (W. H.). *J. Hyg.*, 1933, **33**, 414.

[76] MERKEL (A. E.). *Bull. Hyg.*, 1951, **26**, 1047.

[77] MERKEL (A. E.). *Am. J. publ. Hlth.*, 1951, **41**, 522.

[78] MUELLER (J. H.). *J. Bact.*, 1935, **30**, 513.

[79] MUELLER (J. H.). *J. Immunol.*, 1939, **37**, 103.

[80] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1941, **40**, 21.

[81] MUELLER (J. H.). *J. Immunol.*, 1941, **42**, 343.

[82] MUELLER (J. H.). *J. Immunol.*, 1941, **42**, 353.

[83] MURRAY (J. F.). *J. Path. Bact.*, 1935, **41**, 97.

[84] NIGGEMEYER (H.). *Ann. paediat.*, 1955, **185**, 1.

[85] NIGGEMEYER (H.). *Dtsch. med. Wschr.*, 1955, **80**, 324.

[86] NORLIN (G.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1947, **24**, 505.

[87] NORLIN (G.). *Brit. J. exp. Path.*, 1955, **36**, 599.

[88] OAKLEY (C. L.) et FULTHORPE (A. J.). *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.

[89] OKEELL (G. C.). *J. Hyg.*, 1930, **29**, 309.

[90] O'MEARA (R. A. Q.). *J. Path. Bact.*, 1940, **51**, 317.

[91] OUCHTERLONY (O.). *Ark. Kemi., Min., Geol.*, 1949, **26** B, 1.

[92] OUCHTERLONY (O.), ERICSSON (H.) et NEUMULLER (C.). *Acta med. scand.*, 1950, **138**, 176.

[93] OUCHTERLONY (O.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1953, **22**, 231.

[94] PAPPENHEIMER (A. M.) et JOHNSON (S. J.). *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 335.

[95] PAPPENHEIMER (A. M.). *J. biol. Chem.*, 1937, **120**, 543.

[96] PAPPENHEIMER (A. M.), MUELLER (J. H.) et COHEN (S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1937, **36**, 795.

[97] PAPPENHEIMER (A. M.). *J. biol. Chem.*, 1947, **167**, 251.

[98] PAPPENHEIMER (A. M.) et HENDEE (E. D.). *J. biol. Chem.*, 1947, **171**, 701.

[99] PAPPENHEIMER (A. M.) et LAWRENCE (H. S.). *J. Hyg.*, 1948, **47**, 233, 241.

[100] PAPPENHEIMER (A. M.) et WILLIAMS (C. M.). *J. gen. Physiol.*, 1950, **33**, 579 ; 1952, **35**, 725.

[101] PARISH (H. J.), WHATLEY (E. E.) et O'BRIEN (R. A.). *Brit. med. J.*, 1932, **2**, 915.

[102] PARK (W. H.). *Amer. J. Obstet. and Dis. Women Child.*, 1913, **68**, 1213.

[103] PARK (W. H.) et ZINGHER (A.). *J. Am. med. Ass.*, 1915, **65**, 2216.

[104] PARK (W. H.). *J. Am. med. Ass.*, 1922, **79**, 1584.

[105] PARSONS (E. I.) et FROBISHER (M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1951, **78**, 746.

- [106] PARSONS (E. I.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **90**, 91.
- [107] PETERMANN (M. L.) et PAPPENHEIMER (A. M.). *J. phys. Chem.*, 1941, **45**, 1.
- [107 bis] PETERSON (E. A.) et SOBER (H. A.). *J. Amer. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 751.
- [108] PILLEMER (L.) et ROBBINS (K. C.). *Ann. Rev. Microbiol.*, 1949, **3**, 265.
- [109] POPE (C. G.). *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 218.
- [110] POPE (C. G.) et LINGGOOD (F. V.). *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 297.
- [111] POPE (C. G.), STEVENS (M. F.), CASPARY (E. A.) et FENTON (E. L.). *Brit. J. exp. Path.*, 1951, **32**, 246.
- [112] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Lancet*, 1953, **2**, 1190.
- [113] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1958, **39**, 139.
- [113 bis] QUIGLEY (J. J.). *Amer. J. Hyg.*, 1934, **20**, 218.
- [114] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661.
- [115] RAMON (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1923, **177**, 1338.
- [116] RAMON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, **38**, 1.
- [117] RAMON (G.). *Bull. Soc. Centrale Méd. Vét.*, 1925, **78**, 227.
- [118] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 506.
- [119] RAMON (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1929, **149**, 718.
- [120] RAMON (G.) et BERTHELOT (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 530.
- [121] RAMSHORST (J. D. van). *De bereiding van diphtherie-entstofsen*. Thèse Université d'Utrecht, 1951.
- [122] RANTASALO (I.). *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.*, 1955, **33**, 169.
- [123] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.), MANGALO (R.) et BIZZINI (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 599 ; 1955, **88**, 24.
- [124] RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 424.
- [124 bis] RAYNAUD (M.), ALOUF (J.) et MANGALO (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 276.
- [125] RAYNAUD (M.). *Mechanisms of Hypersensitivity*. Little, Brown et Comp., Boston, Massachusetts, 1959, p. 27-46.
- [126] RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *La réaction toxine-antitoxine diphétique* *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 636.
- [127] RELYVELD (E. H.), TURPIN (A.), LAFFAILLE (A.), PARIS (C.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 301.
- [128] RELYVELD (E. H.), GRABAR (P.), RAYNAUD (M.) et WILLIAMS (C. A. Jr.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 688..
- [129] RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 631.
- [130] RELYVELD (E. H.). *Etude sur la toxine et l'antitoxine diphétiques et la réaction toxine-antitoxine*. Thèse Sciences, Paris 1958. Hermann, édit., Paris (à paraître).
- [131] Ross (V.). *J. Immunol.*, 1949, **63**, 183.
- [132] ROUX (E.) et YERSIN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, **2**, 625.
- [133] RUBINSTEIN (S.), SOSIMA (S. M.) et RAKHMANCHICK (G. I.). *Z. Microbiol. Epidemiol. Immunitätsforsch. (U. R. S. S.)*, 1941, n° 1, 18.
- [134] SALKOWSKY (E.). *Klin. Wschr.*, 1898, **35**, 545.
- [135] SCHEIBEL (I.). *Brit. J. exp. Path.*, 1950, **31**, 442.

[136] SCHMIDT (S.), HANSEN (A.) et KJAER (K. A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **46**, 202.

[137] SIERAKOWSKI (S.) et ZAJDEL (R.). *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1929,

[137 bis] SOBER (H. A.), GUTTER (F. J.), WYCKOFF (M. M.) et PETERSON (E. A.). *J. Am. chem. Soc.*, 1956, **78**, 756.
102, 107.

[138] SMITH (T. H.). *J. med. Res.*, 1907, **16**, 359.

[139] SMITH (T. H.). *J. exp. Med.*, 1909, **11**, 241.

[140] TANNAHILL (R. W.). *J. Hyg.*, 1936, **36**, 140.

[141] TASMAN (A.) et BRANDWYK (A. C.). *Ant. V. Leeuwenhoek*, 1934,
1, 1.

[142] TASMAN (A.), MINKENHOF (J. E.), BRANDWYK (A. C.) et SMITH (L.)
Antonie V. Leeuwenhoek, 1955, **21**, 193.

[143] TAYLOR (E. M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **55**, 474.

[144] TAYLOR (E. M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 510.

[145] TIMMERMAN (W. Aeg), BRANDWYK (A. C.) et PEL (E. A.). *Ned. T. Geneesk.*, 1936, **80**, 3546.

[146] TISELIUS (A.). *Ark. Kemi*, 1955, **7**, 443.

[147] URIEL (J.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 427.

[148] WADSWORTH (A.) et WHEELER (M. W.). *J. inf. Dis.*, 1928, **42**, 179.

[149] WADSWORTH (A.) et WHEELER (M. W.). *J. inf. Dis.*, 1943, **73**, 95.

[150] WALPOLE (G. S.). *Biochem. J.*, 1915, **9**, 284.

[151] WILLIAMS (C. A. Jr). Thèse Rutgers University, New Brunswick.
1954.

[152] WILLIAMS (C. A. Jr) et GRABAR (P.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 158.
397 et 404.

[153] WRIGHT (H. A.) et RANKIN (A. L. K.). *Lancet*, 1932, **2**, 884.

[154] YONEDA (M.). *Nagoya J. med. Sci.*, 1951, **14**, 7.

[155] YONEDA (M.). *Nagoya J. med. Sci.*, 1951, **14**, 69.

[156] YONEDA (M.). *Nature*, 1951, **168**, 879.

LA TOXINE TÉTANIQUE

par A. TURPIN et M. RAYNAUD
(avec la collaboration technique de R. PÉRY).

(Service de Biochimie Bactérienne, Institut Pasteur,
Annexe de Garches [S.-et-O.])

La toxine tétanique est le type même des exotoxines classiques. Depuis que Knud Faber [44], en 1890, a démontré l'existence dans les filtrats de culture de *Plectridium tetani*, d'une toxine permettant la reproduction du syndrome tétanique, de très nombreux milieux ont été proposés pour sa production : les milieux définis synthétiques et semi-synthétiques n'ont donné de résultats réguliers que pour la production de la toxine à petite échelle. Seuls les milieux complexes, par exemple le milieu type Prévot-Boorsma [41] ou le milieu Ramon-Amoureaux-Pochon [43] ont permis la préparation de grandes quantités de toxine de façon régulière.

En 1934, la culture sur milieu synthétique a été réalisée par Feeney, Mueller et Miller [42]. Les facteurs suivants sont indispensables : arginine, histidine, tyrosine, valine, isoleucine, leucine et tryptophane, riboflavine, acide pantothéique, thiamine, acide folique, adénine, biotine, acide oléique, uracile, pyridoxine et acide nicotinique. Le manganèse est nécessaire pour obtenir une croissance optima.

En 1945, Taylor [55] prépare un milieu de culture avec autolyssat de panse de porc et infusion de viande de veau. L'anatoxine que l'on peut obtenir sur ce milieu ne donnerait pas les accidents anaphylactiques que l'on observe avec les anatoxines obtenues à partir de milieux contenant de la peptone de Witte.

Entre 1945 et 1954, Mueller et Miller ont utilisé une large gamme de milieux semi-synthétiques dérivés du milieu de Taylor : milieu à base d'autolyssat de panse de porc, d'infusion de cœur de bœuf, additionné de glucose, chlorure de sodium et fer réduit (1945) [23] ; digestion trypsique de caséine, infusion de cœur de bœuf, glucose, sels minéraux, cystine et tyrosine (1947) [24] ; infusion de cœur de bœuf, pepticase ou N-Z Case (1) remplaçant

(1) N-Z Case : préparation commerciale de peptone de la « Sheffield Chemical Company ».

la digestion trypsique de caséine, sels minéraux, cystine et tyrosine (1948) [25] ; digestion pancréatique de caséine, infusion de cœur de bœuf, glucose, sels minéraux, cystine, tyrosine, pantothéate de calcium, uracile, acide nicotinique, thiamine, riboflavine, pyridoxine, biotine, vitamine B₁₂ et fer réduit (1954) [26].

Les milieux sont ajustés à pH = 7,0-7,2 et laissés cinq jours à 35° C. A petite échelle, c'est-à-dire en tubes de 20 ml, les titres obtenus varient entre 10 et 120 Lf/ml.

En 1954, Fisek, Mueller et Miller [13], par utilisation de digestion pancréatique de caséine (ou de N-Z Case), infusion de cœur de bœuf, glucose, sels minéraux, acides aminés, vitamines, facteurs de croissance et fer réduit, ont obtenu des titres supérieurs à 100 unités sur de faibles quantités de milieu. Les cultures se font en « anaerobic jar » pendant dix-huit à vingt-quatre heures.

Ce milieu a permis à Mueller et Miller d'établir l'existence de facteurs indispensables à la toxinogénèse tétanique, de nature vraisemblablement peptidique [27, 28, 29, 22] : l'un de nature acide (facteur A), l'autre de nature basique (facteur B) ne pouvant agir qu'en présence du premier, un troisième de nature neutre (facteur C).

La fraction acide A contient : sérine, acide glutamique et isoleucine, avec du phosphore combiné à la sérine.

La fraction neutre C est un mélange très complexe, contenant de nombreux amino-acides et divers peptides.

La fraction basique B contient : histidine, arginine, lysine libres et plusieurs peptides contenant de l'histidine ; ces peptides ne peuvent être remplacés par l'histidine libre, mais peuvent l'être par des peptides synthétiques contenant de l'histidine, en particulier par la glycyl-L-histidine.

L'existence de ces facteurs explique que c'est encore pour l'instant sur des milieux empiriques complexes que l'on obtient le plus régulièrement la formation de la toxine tétanique.

L'obtention des toxines à l'état pur présente à la fois un intérêt théorique et pratique et a déjà fait l'objet de nombreuses études. En effet, il est désirable d'obtenir toutes les protéines à l'état pur pour étudier leur nature, leurs propriétés et leur mode d'action, spécialement en ce qui concerne les toxines bactériennes. Il paraît important, d'autre part, de pouvoir préparer une anatoxine tétanique purifiée, la purification éliminant les constituants du bouillon de culture qui ont servi à la préparation des anatoxines, et les protéines microbiennes distinctes de l'anatoxine qui paraissent bien ne jouer aucun rôle dans l'immunisation.

Le vaccin doit contenir tous les composants antigéniques ou le composant antigénique essentiel pour assurer une immunité efficace, mais il est également nécessaire d'enlever tous ceux qui ne jouent pas de rôle dans la défense contre une infection éven-

tuelle et qui, au contraire, peuvent donner des réactions chez des sujets sensibilisés par des injections antérieures.

Ces anatoxines pures peuvent servir aussi à la préparation chez les chevaux, de sérums antitétaniques ne contenant comme seul anticorps que l'antitoxine tétanique (sérums flocons à une zone).

La nature protéique des exotoxines en général et de la toxine tétanique en particulier, est admise depuis fort longtemps. La démonstration expérimentale de ce caractère a cependant reposé jusqu'à ces dernières années sur des arguments indirects : sensibilité à la chaleur, aux agents dénaturants, conditions de précipitation, etc., Mais les travaux plus récents que nous allons examiner ont établi la nature protéique de la toxine tétanique sur des bases chimiques solides.

Les méthodes de purification mises en œuvre sont simples sur le plan théorique, mais la réalisation pratique en reste difficile,

Eaton (1936) [8], puis Eaton et Gronau (1938) [9] ont adsorbé la toxine tétanique sur du phosphate de cadmium. Celui-ci n'est pas ajouté directement dans la solution de toxine, mais on assure sa formation en précipitant les phosphates du milieu de culture par une solution de chlorure de cadmium, après avoir ajusté le pH à 7-7,6. La toxine est ensuite élueée par une solution de phosphate de sodium de pH = 7,8. Le coefficient de purification reste faible, de 20 à 40 en moyenne, et le rendement médiocre (20 p. 100).

Pickett, Hoeprich et Germain (1945) [32] utilisent la précipitation par les sels neutres suivie d'adsorption sur composés cadmiques. Leur meilleure préparation contenait $43 \cdot 10^6$ DMM/mg N, ce qui représente un produit cent fois plus pur que celui obtenu par Eaton et Gronau.

En 1948, Pillemér et ses collaborateurs [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 59] ont obtenu la toxine tétanique sous forme cristallisée. Leurs travaux ont abouti à la préparation d'une toxine présentant les caractères que l'on peut exiger pour affirmer avec une haute probabilité la pureté d'une protéine. Partant d'une toxine obtenue sur milieu de Mueller-Miller, leur méthode consiste en un système de fractionnement par le méthanol à basse température, dans des conditions contrôlées de pH, force ionique et concentration de protéine.

Les caractères physico-chimiques de la toxine cristallisée ont été déterminés.

En 1955, Largier [17-20], par une nouvelle technique de purification appelée « multimembrane electrodecantation » et fractionnement au sulfate d'ammonium, a obtenu une toxine qui paraît pure lorsqu'on lui applique les tests de sédimentation et d'électrophorèse. La toxine brute de départ était produite en sac de cellophane par culture de sept jours à 37° sur milieu panse de porc-infusion de viande de veau.

La toxine tétanique cristallisée remise en solution est stable en présence de glycine entre pH = 5,0 et 6,0. Elle contient 15,7 p. 100 d'azote, 0,065 p. 100 de phosphore, 1,04 p. 100 de soufre, selon Pillemeyer [40, 6]. Sa constante de sédimentation est de 4,5 unités Svedberg, son point isoélectrique 5,1.

Elle présente les caractères suivants : UF/mg N = 3 600 ; DMM/mg N = $66 \cdot 10^6$; DMM/UF = 18 000.

Elle est détoxifiée presque immédiatement par de très faibles quantités de formol. Treize amino-acides ont été titrés par la technique microbiologique [7], les plus importants sont l'acide aspartique (15 p. 100), l'acide glutamique (10 p. 100) et la lysine (10 p. 100). Le poids moléculaire minimum calculé d'après la composition en amino-acides est de 67 300.

Largier a obtenu une toxine sensiblement plus pure que celle de Pillemeyer, présentant les caractères suivants : DMM/mg N = 10^8 et UF/mg N = 4 300 — 4 800. Sa constante de sédimentation est de 3,9 unités Svedberg correspondant à un poids moléculaire de 68 000.

Les préparations de Largier contiennent aussi un deuxième constituant de constante 7,6 que cet auteur a considéré comme un toxoïde spontané, en se basant sur les résultats de Pillemeyer.

L'examen par ultracentrifugation des préparations de Pillemeyer a montré en effet la présence de deux constituants : l'un de constante égale à 4,5 U. S. est considéré comme étant la toxine proprement dite ; le deuxième de constante égale à 7,0 U. S. est, d'après Pillemeyer, un toxoïde formé spontanément (dimère flocculant atoxique). Nous verrons plus loin que cette interprétation doit sans doute être révisée.

Il faut bien noter que l'anatoxine obtenue par action du formol sur la toxine a une constante de 4,6 U. S. (Pillemeyer) ou 4,2 U. S. (Largier). Elle n'est donc pas dimérisée dans les préparations de Pillemeyer et de Largier.

Nous avons nous-mêmes préparé la toxine sous une forme purifiée par la technique suivante :

Dans un premier temps, et pour des raisons d'utilité pratique, nos essais de purification ont porté sur la toxine tétanique brute obtenue sur milieu de Prévot-Boorsma. Ce milieu estensemencé avec la souche Ramon et laissé onze jours à l'étuve à 33°. La toxine a été purifiée par la technique de Pillemeyer à laquelle nous avons apporté seulement quelques légères modifications [57]. Les résultats obtenus ont été très irréguliers, le rendement faible et la toxine de pureté moyenne : elle titrait 1 200-2 000 UF/mg N et $10-40 \cdot 10^6$ DMM/mg N.

Ces résultats confirment les observations de Pillemeyer : la purification par sa méthode donne des résultats qui varient suivant le milieu utilisé pour la préparation de la toxine brute.

L'extraction de la toxine tétanique à partir des corps microbiens [44, 45] fournit une préparation qui contient un nombre d'antigènes beaucoup plus faible que les toxines brutes obtenues par les techniques classiques. Si les corps microbiens sont prélevés en phase exponentielle, ce nombre d'antigènes est réduit à huit, si bien que le fractionnement est beaucoup plus simple et la toxine obtenue beaucoup plus pure [42, 46].

Nous avons préparé les corps bactériens par culture rapide en sac [47] ou par culture anaérobie ordinaire en flacons (milieu Prévot-Boorsma). Dans ce dernier cas, les germes sont récoltés après trois jours de culture à 33°, au début de la phase exponentielle, alors que la presque totalité de la toxine est encore à l'intérieur des corps microbiens et n'a pas encore diffusé appréciablement dans le milieu extérieur. Après trois lavages à l'eau distillée, l'extraction de la toxine a été effectuée à 0° pendant cinq jours, sans agitation, par la solution hypertonique NaCl M/1, citrate M/10. La concentration bactérienne est élevée, correspondant à une densité optique à 540 m μ (photomètre Klett-Summerson) de 6 à 8 (2).

Au bout de cinq jours, les germes résiduels sont éliminés par centrifugation : le liquide surnageant recueilli constitue l'extrait brut E.

Cet extrait est alors précipité par l'acide métaphosphorique à pH = 3,5, à — 15°, en présence de 23,5 g par litre de chlorure de sodium [48, 58]. La toxine ainsi précipitée est fractionnée par le mélange concentré de phosphates 3,5 M mono et dipotassique de pH = 6,8 [3]. La toxine précipite pour des concentrations salines comprises entre 1,15 et 1,75 M pour une solution de 500 UF/ml. Le précipité P₅₀ est recueilli par filtration sur papier. Il est ensuite mis en suspension (600 UF/ml) pendant dix-huit heures à — 5° C, dans un mélange présentant la composition suivante : acétate de sodium, 0,100 M ; méthanol, 7,5 p.. 100 : pH = 4,0 (le pH est ajusté par addition d'acide acétique).

On obtient un résidu insoluble qui est éliminé par centrifugation et une *fraction soluble* qui contient la toxine (fraction Me). On dialyse la solution de toxine Me (concentration : 600-1 000 Lf/ml) contre du phosphate monodipotassique 1,75 M pendant dix-huit heures à 0°. Il se forme un précipité de toxine qui est recueilli par filtration à basse température (— 5°). On le redissout soit en phosphate disodique 0,07 M pH = 8,2, soit en acétate de sodium 0,150 M pH = 6,8, soit en glycine 0,1 M pH = 6,8. Le produit obtenu est appelé T₅.

Le rendement final par rapport à l'extrait brut de départ est de 40 p. 100.

(2) La mesure est effectuée après dilution convenable, de façon que la lecture corresponde à l'intervalle 0-100 unités Klett.

Les tableaux I, II et III résument les étapes de nos diverses purifications.

La capacité de combinaison (Lf) et le temps de flocculation optimum (Kf) ont été déterminés par la méthode de Ramon

TABLEAU I. — Propriétés des fractions obtenues lors de la purification de la toxine tétanique (*).

	N°	UF/ml	Kf (minutes)	UF/mgN	DMM/mgNx10 ⁶	DM ₅₀ /mgNx10 ⁶
M	1	60	40	310	4,7	5
	2	140	30	300	6,3	11
	3	450	2	270	6	
	4	320	2	290	9	
	5	340	20	200	4,7	
	6	200	30	280	4,3	
M	1	300	20	1200	40	72
	2	2500	20	1310	32	44
	3	800	12	1060	26	
	5	340	7	850	20	
	6	600	20	1150	29	
	1	800	10	2500	62	109
F ₅₀	2	2500	20	2170	52	66
	5	1050	5	1750	66	
	6	1600	10	2000	50	
	1	400	7	4400	110	140
Me	2	1800	7	3600	80	
	5	900	2	3400	76	
	6	1500	5	2730	63	

(*) Toxine brute préparée par extraction des corps microbiens obtenus par culture en flacons à 33°.

(Volume total variable. Niveau 50 Lf de toxine). La dose minima mortelle a été déterminée sur souris de 18 à 20 g. La durée d'observation était de quatre jours. La dose mortelle 50 a été calculée par la méthode des log-probit.

On notera que, suivant le mode de culture utilisée, la même

technique donne des produits doués d'activité spécifique variable.

Le nombre des constituants a été déterminé par la méthode d'Oudin [31], technique Oakley-Fulthorpe [30].

Extrait brut	8 à 10	constituants
M	4	constituants
P ₅₀	3	constituants
T ₅	1 (+2)	constituant

TABLEAU II. — Propriétés d'une série de préparations similaires T₅.

	N°	UF/ml	Kf (minutes)	UF/mgN	DMM/mgNx10 ⁶	DMM/UFx10 ³
T ₅	1	400	4	4400	110	25
	2	900	5	3700	83	22
	3	2200	1	3600	66	18
	4	2000	1	3500	71	20
	5	1000	1	3700	92	25
	6	3500	2	3500	70	20
	7	3000	2	3600	37	10
	8	1000	3	3330	33	10
	9	4500	1	3000	66	22
	10	5000	1	3800	69	18
	11	4000	1	2850	71	25
	12	4500	1	3000	200	66

Il existe dans les préparations T₅ un constituant nettement prédominant qui est la toxine, comme le montrent les images obtenues à l'équivalence, et deux constituants mineurs qui ne sont bien visibles que pour les fortes concentrations d'antigène.

PLANCHE I Précipitation spécifique en gel.

Dans la partie inférieure des tubes : sérum gélosé complexe n° 1429. Dans la partie moyenne : gélose. Dans la partie supérieure : antigène en milieu liquide non gélosé. Les chiffres S₁₀₀ ou S₅₀ indiquent la concentration en antitoxine (100 ou 50 Lf(A)/ml). Les chiffres supérieurs indiquent les concentrations en toxine : de 500 à 50 Lf(T)/ml. FIG. 1. — Extrait brut. FIG. 2. — Préparation M. FIG. 3. — Préparation P₅₀. FIG. 4. — Préparations T₅. Dans la figure 4, le sérum utilisé est à une concentration de 100 Lf/ml dans la partie inférieure.

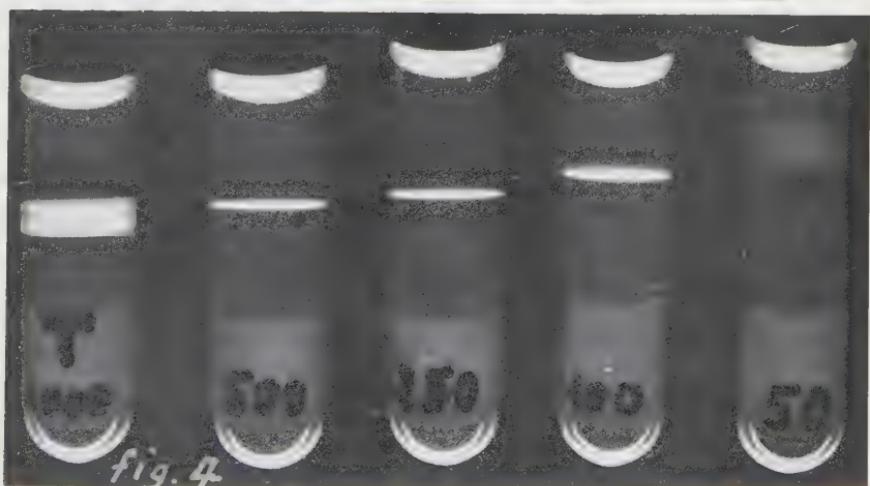
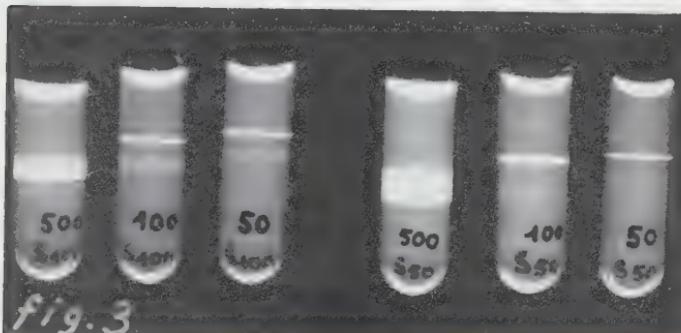


PLANCHE 1.

PLANCHE II

La toxine pure T a été utilisée à la concentration de 250 unités Lf de toxine.
La toxine pure digérée TD a été utilisée à la concentration de 250 unités Lf de
toxine digérée. Les chiffres indiquent les concentrations en unités Lf de sérum.
Cheval 815: Non vacciné antérieurement. Fig. 1. — Saignée du 7 mai 1957:
Fig. 2. — Saignée du 28 mai 1957. *Cheval 545*: Vacciné antérieurement.
Fig. 3. — Saignée du 21 mai 1957.

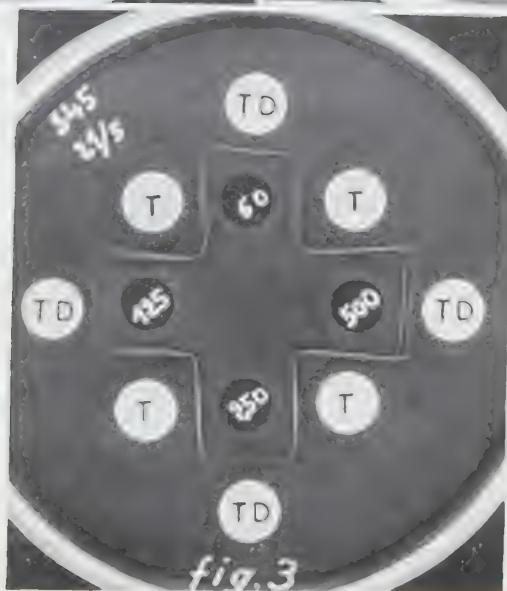
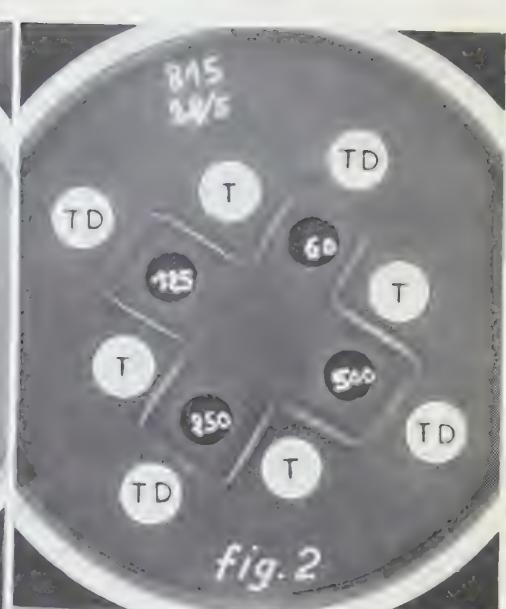


PLANCHE II.



Nous avons également essayé de purifier la toxine tétanique par chromatographie des fractions T_5 sur phosphate de calcium selon Tiselius [56].

La toxine en solution dans un tampon de faible force ionique (phosphate monodipotassique 0,01 M pH = 6,8) est adsorbée entièrement sur phosphate de calcium.

TABLEAU III. — Propriétés des fractions obtenues lors de la purification de la toxine tétanique (*).

	N°	UF/ml	Kf (minutes)	UF, mg N	DMM/mg Nx10 ⁶	DMM/UFx10 ³
E	1	40	120	350	—	—
	2	15	120	157	1,7	—
	3	40	60	303	—	—
M	2	40	120	1530	15	—
	3	100	30	2000	—	—
	1	70	60	2500	42	—
P ₅₀	2	70	30	2500	31	—
	3	300	20	3000	—	—
	1	20	12	3800	72	—
Me	3	400	10	5000	187	—
	1	25	3	4500	120	26
T ₅	2	380	3	3200	50	15
	3	400	4	5000	187	37

(*) Toxine brute préparée par extraction de corps microbiens obtenus par culture en sac de cellophane à 35°.

Sur une colonne de 2 cm de diamètre et 20 cm de hauteur, on peut adsorber 10 000 à 15 000 Lf de toxine. Le développement se fait avec des solutions salines de concentrations de plus en plus élevées (phosphate monodipotassique pH = 6,8 0,01 M à 0,1 M). Le liquide d'élution est recueilli par fractions de 10 ml sur un collecteur.

Les résultats obtenus ont été très irréguliers. On observe plusieurs pics. L'un d'entre eux contenant la majeure partie de la toxine est élué par le tampon monodipotassique 0,05 M, avec un rendement de 10 à 20 p. 100. La purification reste faible. Une seule fois cependant, nous avons pu obtenir une fraction titrant 4 500 UF/mg N.

Mais les résultats de chromatographie sur brushite nous ont fourni des renseignements permettant de préparer une anatoxine adsorbée sur phosphate de calcium destinée à la vaccination et à l'hyperimmunisation. La toxine est complètement adsorbée à partir de solutions de faible concentration en phosphate et à pH = 6,8. La technique la plus efficace consiste à ajouter une

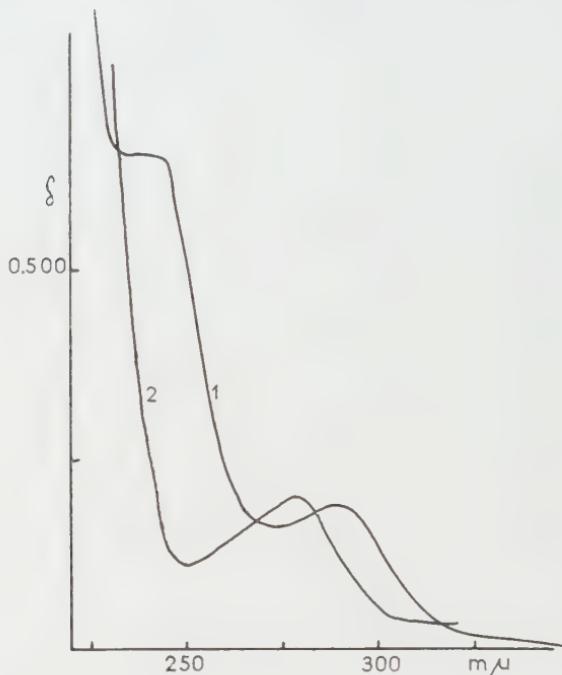


FIG. 1. — Spectre 1 : Toxine tétanique pure en soude 0,1 N (pH = 13). Concentration : 50 Lf/ml. Spectre 2 : Toxine tétanique pure en phosphate monodikotassique 0,1 M (pH = 7,0). Concentration : 50 Lf/ml.

solution de chlorure de calcium 0,07 M à un volume égal de solution d'anatoxine en phosphate disodique 0,07 M de pH = 6,8 [49].

Une solution de toxine purifiée suivant les techniques décrites et titrant 3 000 Lf/ml, est très légèrement colorée en jaune. Nous la conservons dans un des tampons suivants : acétate de sodium 0,150 M (pH = 6,8), phosphate disodique 0,07 M (pH = 8,2), phosphate monodikotassique 0,1 M (pH = 6,8), cystéine 0,01 M (pH = 6,0).

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet a été déterminé à différents pH (fig. 1).

Nos divers lots de toxine purifiée ont des rapports oscillant entre 2 850 et 4 400 UF/mg N, 33 et $200 \cdot 10^6$ DMM/mg N et 10 000 et 60 000 DMM/UF.

A l'ultracentrifugation, on ne trouve qu'un seul constituant.

La toxine purifiée est transformée rapidement en anatoxine. Elle est détoxifiée à un pH = 8,0-8,2 à 37° par une quantité de formol égale à 1,75 µg par unité de flocculation. L'addition de formol amène une baisse quasi immédiate de la toxicité qui est ramenée à 50 ou 30 p. 100 de sa valeur initiale.

La détoxification se poursuit ensuite en deux phases. Dans la première phase, qui dure environ vingt-quatre heures, la toxicité diminue de façon exponentielle en fonction du temps, jusqu'à une valeur très faible, mais non nulle. La toxicité résiduelle dis-

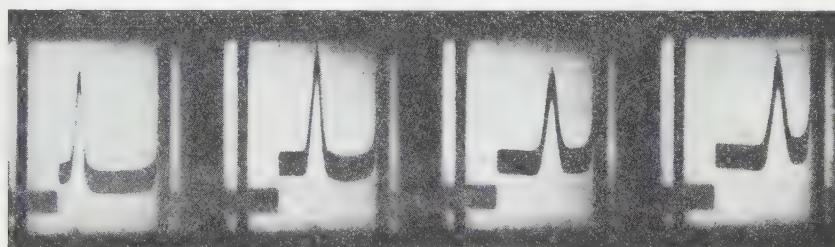


FIG. 2. — *Ultracentrifugation de la toxine tétanique pure. T₅ (18 novembre 1955) ; 4 000 Lf/ml ; Δn = 2,59 × 10⁻³. Solution en cystéine 0,1 M de pH = 6,8. Dialyse contre acétate de sodium 0,2 M de pH = 6,8. Un seul constituant : S = 7,1. Cette opération a été effectuée à la Station Centrale d'Ultracentrifugation du C. N. R. S. (professeurs Wurmscr et Tonnelat).*

paraît dans une deuxième phase, suivant un processus plus lent. La détoxification est complète en deux à cinq jours.

La détoxification avec conservation du pouvoir flocculant peut être réalisée avec d'autres réactifs : la β-propiolactone [21] et le 2-4-dinitrofluorobenzène.

Si l'on fait agir sur la toxine tétanique (200 µg d'azote/ml) de la β-propiolactone (concentration finale 1 p. 100) à 0°, on note une disparition rapide de la toxicité. Au bout de vingt-quatre heures, le dérivé obtenu, complètement atoxique, continue à flocculer avec le sérum antitétanique.

Le 2-4 dinitrofluorobenzène réagit comme la β-propiolactone avec certains groupes réactifs de la toxine, en particulier avec les groupes ε-NH₂ de la lysine.

Blass [2] a mis au point une méthode de dosage des groupes ε-NH₂ de la lysine combinés au formol dans l'anatoxine-formol, basée sur le principe suivant : si l'on fait réagir le 2-4 dinitro-

fluorobenzène en excès sur une solution de toxine suffisamment concentrée, tous les groupes $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine réagissent avec le dinitrofluorobenzène. On retrouve dans l'hydrolysat toute la lysine sous forme d' $\epsilon\text{-DNP}$ lysine que l'on peut titrer par détermination de son spectre d'absorption (maximum 360 m μ) [53].

Si l'on fait réagir le 2-4 dinitrofluorobenzène sur une solution d'anatoxine de haute pureté, les groupes $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine combinés au formol ne réagissent pas avec le dinitrofluorobenzène. Les groupes méthyléniques étant éliminés par hydrolyse acide, la fraction $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine combinée au formol est obtenue sous forme de lysine libre que l'on peut titrer directement.

On peut également titrer cette fraction par différence entre les teneurs en $\epsilon\text{-DNP}$ lysine des hydrolysats acides de la toxine et de l'anatoxine dinitrophénylées.

Ces deux modes de dosage ont permis de constater que 26 p. 100 des groupes $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine étaient bloqués par le formol dans l'échantillon d'anatoxine examiné.

En se basant sur ce résultat, on a effectué une étude systématique qui a permis de trouver les conditions dans lesquelles le dinitrofluorobenzène ne se combine qu'avec 30 p. 100 environ des groupes $\epsilon\text{-NH}_2$ libres de la toxine.

On fait réagir une solution très diluée de 2-4 dinitrofluorobenzène (concentration finale 0,32 $\mu\text{g/ml}$) sur une solution de toxine tétaïtique de haute pureté (concentration en toxine 200 μg d'azote par millilitre) à pH = 8,2.

Nous avons observé en vingt-quatre heures à 20° une disparition complète de la toxicité. Le produit continue de réagir avec l'antisérum antitétaïtique et son activité flocculante est de 80 p. 100 environ de celle de la toxine de départ [50]. Son activité immuno-génique est à l'étude.

La constante de sédimentation de notre préparation a été déterminée sur plusieurs échantillons : ces derniers ne contiennent qu'un seul constituant de constante égale à 6,3 unités Svedberg. Ce chiffre ne correspond pas aux données de Pillemér et de Largier.

Pillemér avait trouvé pour sa toxine une valeur de 4,5 U. S., mais il observait après conservation à 0° un second constituant de constante 7,0. Il interprétait ce résultat en considérant que la toxine s'était transformée en un dimère flocculant atoxique. Largier a retrouvé dans ses préparations purifiées ces deux constituants : l'un de constante 3,9, l'autre de constante 7,0. Il admet que le deuxième est un dimère atoxique.

D'autre part, les préparations que nous avons obtenues de constante 6,3 ont une activité toxique de l'ordre de 60 à 100. 10⁶ DMM/mg N, analogue à celle de la toxine de Pillemér de

constante 4,5 U. S. Notre préparation ne peut donc être considérée comme un toxoïde spontané.

Devant des résultats aussi contradictoires, nous nous sommes demandé si le constituant de constante 7,0, présent dans la préparation de Pillemeyer, au lieu d'être un toxoïde spontané, n'était pas tout simplement un polymère toxique du constituant de S = 4,5.

Si cette hypothèse est exacte, nous devons pouvoir obtenir à partir de notre préparation des toxines présentant divers états d'agrégation.

Nous avons soumis notre toxine à l'action de la cystéine qui peut provoquer la dépolymérisation de certaines protéines [4, 5], puis du monoiodacétate de sodium qui empêche la réaggrégation.

Après dialyse contre la cystéine 0,01 M ou 0,1 M, la constante de sédimentation est peu modifiée. Mais si cette solution en cystéine est dialysée contre du monoiodacétate de sodium 0,1 M, on peut voir apparaître deux composés, l'un de constante 2,25 U. S., l'autre de constante 5,50 U. S. Si la solution en cystéine est dialysée contre du cyanure de potassium 0,1 M, on obtient un constituant unique de constante 3,9 U. S. [51].

On peut donc sous l'influence de la cystéine mettre en évidence une dépolymérisation, à condition de bloquer les structures apparues par un réactif du groupe sulfhydryle : monoiodacétate de sodium, cyanure de potassium, parachloromercuribenzoate de sodium.

Nous avons de même soumis notre préparation à l'action du mercuridioxane dans l'espoir de provoquer une dimérisation de la toxine, dimérisation que Straessle et coll. ont obtenu avec la sérumalbumine humaine [54, 10, 11].

Le mercuridioxane donne avec la toxine tétanique un précipité immédiat, pouvant être redissous en cystéine 0,01 M ($\text{pH} = 6,8$), en sulfhydrate de sodium, en sulfhydrate d'ammonium. Le pouvoir flocculant est conservé. Les solutions en cystéine restent toxiques.

La teneur exacte en mercure de ces diverses préparations est à l'étude. Leur comportement à l'ultracentrifugation a déjà été examiné. Le précipité de toxine-mercuridioxane redissous en cystéine a une constante de sédimentation comprise entre 6,4 et 7,3 suivant les préparations. Par dialyse de cette solution contre le monoiodacétate de sodium, on arrive vraisemblablement à empêcher la repolymérisation : on trouve en effet deux composés de constantes respectives : 1,96 U. S. et 4,05 U. S.

Le précipité de toxine mercuridioxane redissous en sulfhydrate de sodium a une constante comprise entre 6,0 et 7,5, suivant les préparations.

La combinaison avec le formol semble stabiliser certaines de ces structures. Notre préparation d'anatoxine obtenue par action

du formol sur la toxine T_5 contient deux éléments de constantes respectives, 4,9 U. S. et 7,2 U. S.

Il semble donc bien que la toxine tétanique puisse exister sous plusieurs états d'agrégation tout en conservant sa toxicité et ses propriétés floculantes [4].

Les effets de l'état d'agrégation de la toxine sur la forme de la courbe de précipitation quantitative restent à élucider.

Les amino-acides N et C terminaux sont en voie de détermination.

La toxine tétanique paraît posséder plusieurs « emplacements » antigéniques distincts, un seul de ces « emplacements » donnant naissance à des anticorps neutralisants. La multiplicité de ces « emplacements » a été mise en évidence par la méthode de Lapresle [15, 16] : la toxine tétanique, après digestion ménagée par la trypsine cristallisée à 37° et à pH = 8,2 donne deux lignes distinctes avec la plupart des sérum lorsqu'on utilise la technique d'Ouchterlony (pl. II).

L'hyperimmunisation par l'anatoxine tétanique pure adsorbée sur phosphate de calcium, de chevaux non antérieurement vaccinés [52], a donné des séums de haut titre floculant (vis-à-vis de la toxine pure) et de faible pouvoir neutralisant. Les précipités spécifiques obtenus en faisant réagir ces séums spéciaux avec la toxine pure contiennent de la toxine non neutralisée, pour certains rapports antigène/anticorps.

Ces faits semblent démontrer l'hétérogénéité des anticorps obtenus par injection de la toxine purifiée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BIZZINI (B.), TURPIN (A.) et RAYNAUD (M.). [A paraître].
- [2] BLASS (J.) et RAYNAUD (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.* (à paraître).
- [3] BUTLER (A. M.) et MONTGOMERY (H.). *J. biol. Chem.*, 1933, **99**, 173.
- [4] DEUTSCH (H. F.) et MORTON (J. I.). *Science*, 1957, **125**, 600.
- [5] DEUTSCH (H. F.) et MORTON (J. I.). *Feder. Proceed.*, 1957, **16**, 172.
- [6] DUNN (M. S.), CAMIEN (M. N.) et PILLEMER (L.). *Arch. Bioch.*, 1949, **22**, 374.
- [7] DUNN (M. S.), CAMIEN (M. N.) et coll. *Univ. California Pubs. Physiol.*, 1949, **8**, 293.
- [8] EATON (M. D.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1936-1937, **35**, 16.
- [9] EATON (M. D.) et GRONAU (A.). *J. Bact.*, 1938, **36**, 423.
- [10] EDELHOCH (H.), KATCHALSKI (E.), MAYBURY (R. H.), HUGHES (W. L.) et EDSELL (J. T.). *J. Am. chem. Soc.*, 1953, **57**, 5058.
- [11] EDSALL (J. T.), MAYBURY (R. H.), SIMPSON (R. B.) et STRAESSLE (R.). *J. Am. chem. Soc.*, 1954, **76**, 3131.
- [12] FEENEY (R. E.), MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1943, **46**, 563.

- [43] FISEK (N. H.), MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 329.
- [44] KNUD FABER. *B. K. W.*, 1890, **27**, 717.
- [45] LAPRESLE (Cl.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 969 et *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 654.
- [46] LAPRESLE (Cl.) et DURIEUX (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, 833. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 62 ; 1958, **94**, 38.
- [47] LARGIER (J. F.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1955, **46**, 291.
- [48] LARGIER (J. F.) et JOUBERT (F. J.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1956, **20**, 407.
- [49] LARGIER (J. F.). *J. Immunol.*, 1956, **76**, 393.
- [50] LARGIER (J. F.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1956, **24**, 433.
- [51] LO GRIPPO (G. A.) et HARTMAN (F. W.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 123.
- [52] MILLER (P. A.). *Bact. Proceed.*, 1955, 126.
- [53] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1945, **50**, 377.
- [54] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1947, **56**, 143.
- [55] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 219.
- [56] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 271.
- [57] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *N. Y. Acad. Sci.*, 1953, **46**, 20.
- [58] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 634.
- [59] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. biol. Chem.*, 1956, **223**, 185.
- [60] OAKLEY (C. L.) et FULTHORPE (A. J.). *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.
- [61] OUDIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 30 et 109.
- [62] PICKETT (M. J.), HOEPRICH (P. D.) et GERMAIN (R. O.). *J. Bact.*, 1945, **49**, 515.
- [63] PILLEMER (L.). *J. Immunol.*, 1946, **53**, 237.
- [64] PILLEMER (L.), GROSSBERG (D. B.) et WITTLER (R. G.). *J. Immunol.*, 1946, **54**, 213.
- [65] PILLEMER (L.), WITTLER (R. G.) et GROSSBERG (D. B.). *Nature*, 1946, **103**, 615.
- [66] PILLEMER (L.), WITTLER (R. G.), BURREL (J. I.) et GROSSBERG (D. B.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 205.
- [67] PILLEMER (L.) et TOLL (D.). *Science*, 1947, **105**, 102.
- [68] PILLEMER (L.), TOLL (D.) et BADGER (S. J.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **170**, 571.
- [69] PILLEMER (L.), BURREL (J. I.) et ROSS (O. A.). *Science*, 1947, **106**, 36.
- [70] PILLEMER (L.) et MOORE (D. H.). *J. biol. Chem.*, 1948, **173**, 427.
- [71] PRÉVOT (A.-R.) et BOORSMA (H. G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **63**, 600.
- [72] RAFIYI (A.), CHAMSY (M.) et DELSAL (J. L.). *Rev. Immunol.*, 1954, **18**, 391.
- [73] RAMON (G.), AMOUREUX (G.) et POCHON (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 8, et *Rev. Immunol.*, 1943, **8**, 115.
- [74] RAYNAUD (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 543.
- [75] RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 356.
- [76] RAYNAUD (M.) et TURPIN (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 574.
- [77] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.), MANGALO (R.) et BIZZINI (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 599 ; 1955, **88**, 24.
- [78] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.) et NICOL (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 2122.

[49] RAYNAUD (M.), RELYVELD (E. H.), TURPIN (A.) et MANGALO (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 60.

[50] RAYNAUD (M.), BLASS (J.) et TURPIN (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 862.

[51] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.), BIZZINI (B.) et TONNELAT (J.). [A paraître.]

[52] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.), RELYVELD (E. H.), CORVAZIER (R.) et GIRARD (O.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 649.

[53] SANGER (F.). *Bioch. J.*, 1949, **45**, 563.

[54] STRAESSELE (R.). *J. Am. chem. Soc.*, 1951, **73**, 504, et 1954, **76**, 3138.

[55] TAYLOR (E. M.). *J. Immunol.*, 1945, **50**, 385.

[56] TISELIUS (A.). *Ark. Kemi (Stockholm)*, 1955, **7**, 443.

[57] TURPIN (A.), RAYNAUD (M.) et ROUYER (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 299.

[58] TURPIN (A.), RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 25.

[59] WITTLER (R. G.) et PILLEMER (L.). *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 23

LE RÉCEPTEUR DE LA TOXINE TÉTANIQUE DANS LE TISSU NERVEUX (*)

par W. E. VAN HEYNINGEN.

Il a toujours paru évident que la toxine tétanique agissait uniquement sur le système nerveux et principalement, sinon exclusivement, sur le système nerveux central. Elle provoque en effet une paralysie spastique qui fixe dans un état effroyable de rigidité les sujets atteints de tétanos (fig. 1). Cette rigidité résulte de la contraction de divers muscles en sens opposé, l'inhibition qui émane normalement du système nerveux central se trouvant supprimée, alors que l'excitation persiste non modifiée.

Chez le sujet tétanique, quand un groupe de muscles se trouve stimulé à se contracter, les muscles antagonistes ne se relâchent pas ; ils sont probablement excités par réflexe de tension et se contractent, tendant à provoquer un mouvement en sens inverse des premiers. Ce mécanisme a été vérifié récemment par Brooks, Curtiss et Eccles [1]. Ces auteurs ont démontré que la toxine tétanique supprime l'inhibition synaptique, soit en empêchant la libération du médiateur chimique inhibiteur à partir de la terminaison présynaptique de l'interneurone, soit en empêchant l'accès du médiateur à la membrane subsynaptique du neurone moteur (fig. 2).

On peut en déduire que la lésion biochimique primaire provoquée par la toxine tétanique doit résulter de l'action de cette dernière sur une substance présente dans les synapses inhibitrices, synapses qui se trouvent toutes situées dans la substance grise du tissu nerveux. Pour le biochimiste, le problème consiste donc à identifier cette substance sensible.

Par où peut-on commencer une investigation de ce genre ? Quand on injecte à l'animal de la toxine tétanique, même à dose très élevée, on n'observe aucune lésion visible dans le tissu nerveux ni dans aucun autre tissu. Cette absence de lésion nous prive de toute indication, même indirecte, sur le mécanisme d'action de la toxine [15]. Il existe pourtant une voie d'abord possible, qui nous a été suggérée par une expérience réalisée il y a soixante ans, quelques années seulement après la décou-

(*) On a donné ailleurs un compte rendu détaillé du travail qui fait l'objet de la présente étude [22].

verte de la toxine tétanique : il s'agit du phénomène bien connu de Wassermann-Takaki.

Wassermann et Takaki [23] remarquèrent qu'en ajoutant à une émulsion de tissu nerveux quelques doses mortelles de toxine tétanique, la toxicité se trouvait réduite. Cette réduction de toxicité est beaucoup plus marquée si l'on filtre le mélange avant l'injection. La toxine a été fixée par le tissu nerveux de toute évidence. Le tissu cérébral est plus efficace que la moelle épinière et la substance grise, plus que la substance blanche. Ce phénomène suscita un grand intérêt dans les dix années qui suivirent sa découverte. De nombreux investigateurs cherchèrent à identifier



FIG. 1. — Tétanos.

la substance responsable de la fixation de la toxine, mais les résultats restèrent très confus.

De nombreuses substances : graisses, cholestérol, phospholipides, sphingolipides, protéines, sont en effet présentes dans les différentes fractions qui furent préparées. Cette confusion était due en partie au fait qu'il était difficile, surtout à cette époque, de faire des séparations chimiques correctes des différents constituants du tissu nerveux. Les recherches les plus intéressantes furent celles de Landsteiner et Botteri [40] qui établirent que le protagon est la fraction la plus active comme récepteur de la toxine.

Le protagon est constitué par la fraction complexe qui peut être extraite du tissu nerveux par l'alcool chaud après épuisement préalable par l'acétone et l'éther. C'est un mélange de sphingolipides insolubles dans l'eau et formés principalement de cérébrosides et de sphingomyéline (fig. 3). Landsteiner croyait que la phrénosine était le récepteur de la toxine. Il restait cependant intrigué par le fait que la substance blanche qui est beau-

coup plus riche en phrénosine que la substance grise est moins active que cette dernière comme récepteur de la toxine. Nous verrons plus loin l'interprétation que nous pouvons fournir aujourd'hui de cette constatation paradoxale. L'intérêt pour ce

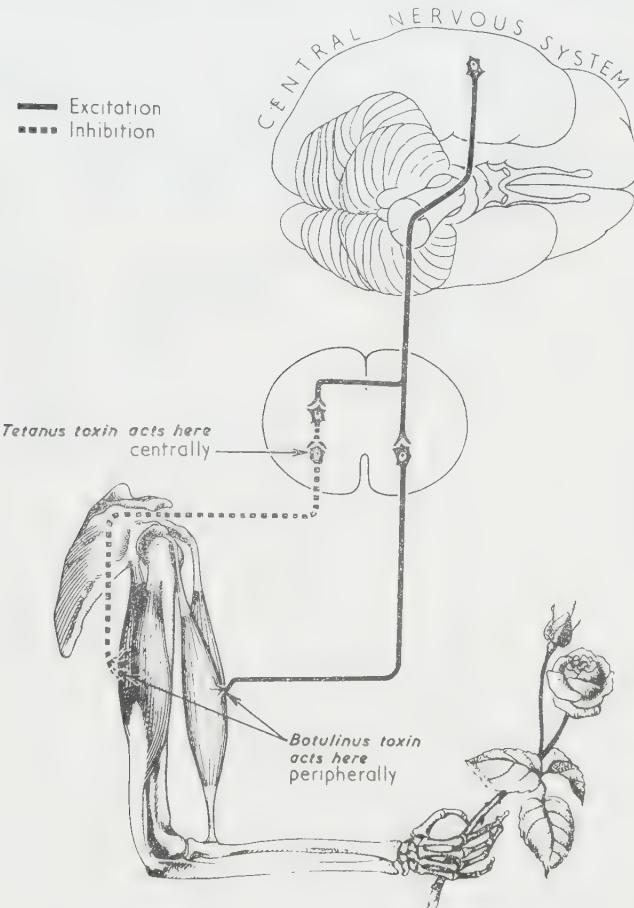


FIG. 2. — Le système nerveux central (simplifié).

phénomène diminua par la suite et les recherches sur ce sujet s'espacèrent considérablement.

Un résultat important fut acquis toutefois pendant cette période, à savoir : que le phénomène était spécifique, ne s'observant qu'avec la toxine tétanique. Coleman [2] démontra que ni les toxines botuliniques, ni la toxine diphétique ne sont fixées par

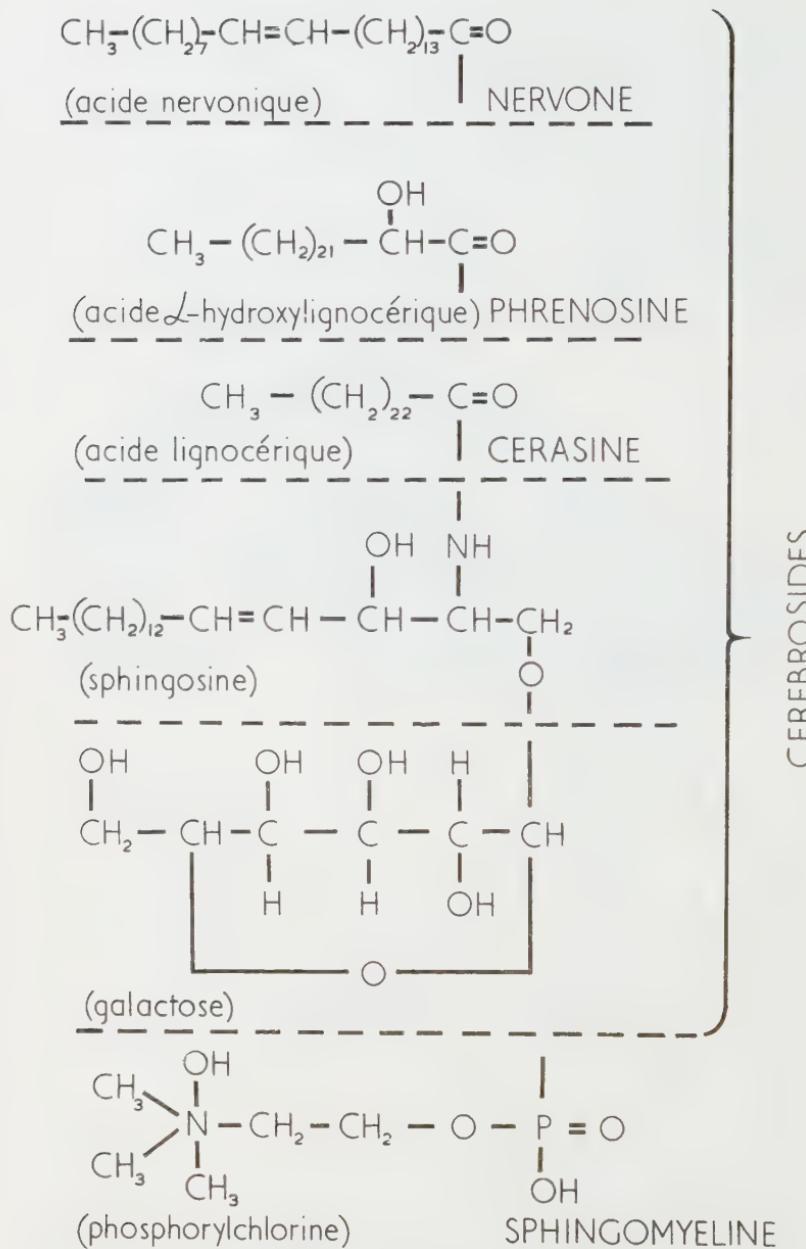


FIG. 3. — Les sphingolipides du protagon.

le tissu nerveux. Fulthorpe [7] établit que la toxine diptérique, les toxines de *Clostridium oedematiens*, de *Cl. welchii* et du staphylocoque, ne sont pas fixées non plus par le tissu nerveux. D'après Pons [17] et Fulthorpe [7], le cerveau entier ne fixe pas l'anatoxine tétanique. Mais nous verrons plus loin qu'il convient d'interpréter cette observation.

Cette spécificité suggérait qu'il devait y avoir un certain rapport, non dépourvu de signification, entre la toxine tétanique et sa substance réceptrice.

TABLEAU I. — Pouvoir récepteur de différents composants du cerveau.

Substance	Quantité (en mg) fixant 20 L+ de toxine.
Cerveau entier de boeuf (poids sec)	20
Substance grise	8,3
Substance blanche	60
Fraction acétono-soluble	35
Fraction éthéro-soluble	35
Résidu après extraction	35
Protagon du cerveau entier	0,45
Protagon de la substance grise	0,30
Protagon de la substance blanche	3,3
Protagon de la moelle épinière	4,0
Phrénosine brute	0,60
Phrénosine purifiée	5,0
Cérebrosides purifiés mixtes	5,0
Sphingomyéline purifiée	35

Ce sont là les raisons qui m'ont décidé à chercher confirmation de la spécificité du phénomène et à essayer d'identifier le récepteur.

Pendant les premières étapes de ces recherches, nous avons utilisé un essai biologique de l'activité du récepteur. L'épreuve comporte la détermination de la plus faible quantité de substance capable de fixer une dose déterminée de toxine (20 unités L+). Les détails de cet essai sont maintenant dépourvus d'intérêt et je me contenterai de mentionner dans le tableau I quelques-uns des résultats préliminaires obtenus. Ces résultats confirment la plupart des observations anciennes et fournissent en même temps l'explication de la contradiction relevée par Landsteiner.

La substance grise contient plus de récepteur que la substance blanche et le protagon est hautement actif.

L'activité du protagon n'est pas due à sa teneur en phrénosine. Seules les préparations brutes de phrénosine sont actives et la phrénosine elle-même, lorsqu'elle a été suffisamment purifiée, est dépourvue d'activité.

Le protagon, préparé à partir de la substance grise, est environ dix fois plus actif que le protagon préparé à partir de la substance blanche.

Le récepteur est donc un contaminant de la phrénosine brute ;

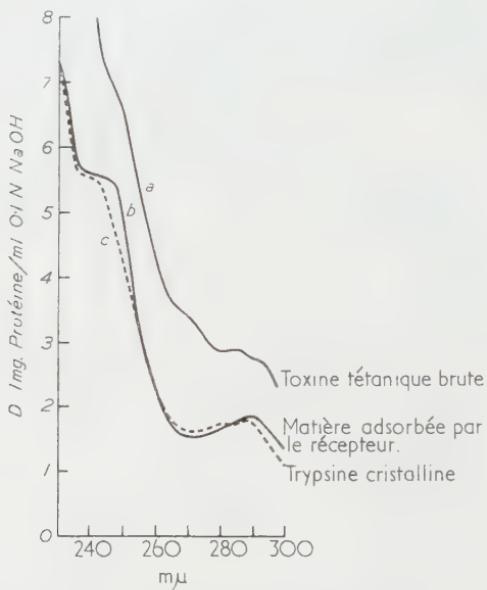


FIG. 4. — Spectre d'absorption dans l'U. V. de la toxine tétanique brute et de la substance adsorbée par le récepteur.

il est beaucoup plus abondant dans la substance grise que dans la substance blanche.

Tous les essais tentés pour séparer le récepteur de la phrénosine par extraction ou absorption ont échoué.

Je me décidai alors à essayer le fractionnement par distribution à contre-courant entre solvants non miscibles, selon Craig. Mais cette technique nécessitant le titrage de très nombreuses fractions, il me fallait d'abord trouver un dosage chimique simple, plus facile à effectuer en série que le dosage biologique.

Le titrage que j'ai mis au point repose sur l'hypothèse, qui fut bientôt amplement vérifiée, que la seule protéine qui soit fixée par le protagon est la toxine tétanique, les autres protéines n'étant pas adsorbées. Il suffit alors de titrer chimiquement les protéines

adsorbées [14]. La quantité de protéine adsorbée à partir d'une solution donnée de toxine tétanique doit être proportionnelle à la quantité de récepteur ajoutée et complètement indépendante de la pureté de la préparation de toxine utilisée. Les courbes de la figure 4 représentent le spectre d'absorption de la toxine brute utilisée dans la plupart de nos expériences.

La courbe *b* montre l'absorption dans l'U. V. d'une préparation obtenue de la façon suivante : la toxine brute a été traitée par une suspension de protagon ; le complexe protagon-toxine a été recueilli par centrifugation et la matière adsorbée redissoute en milieu alcalin. Le spectre d'absorption est typiquement celui

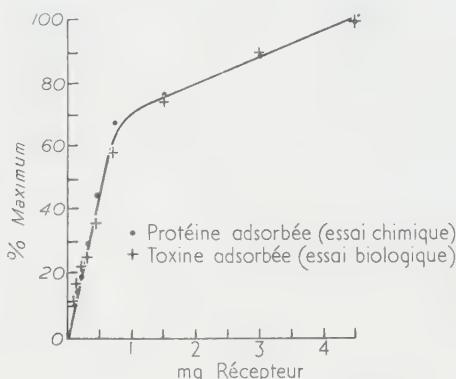


FIG. 5. — Corrélation entre la toxine et la protéine adsorbée par le récepteur.

d'une protéine, comme le montre la comparaison avec la courbe *c*, relative à la trypsine cristallisée.

L'expérience résumée sur la figure 5 établit que la protéine adsorbée par le protagon est constituée uniquement par la toxine proprement dite.

Des concentrations croissantes de protagon ont été ajoutées à une quantité fixe de toxine brute. On a mesuré par spectrophotométrie la quantité de protéine adsorbée (après redissolution du complexe toxine-protagon en soude N/10).

La quantité de toxine adsorbée a été déterminée par différence. On a titré par essai biologique (unités L+) la toxine avant et après adsorption.

Les résultats des deux types de détermination sont concordants. Chaque paire de points fournit une valeur pour la teneur en protéine d'une unité L+ de toxine. La moyenne de 9 déterminations effectuées donne la valeur de 1,91 µg de protéine par unité L+ de toxine. Ce chiffre est en bon accord avec la valeur

obtenue par Pillemeyer et coll. [16], à savoir : 2,02 à 2,15 µg de protéine par unité L+ (1).

Le caractère spécifique de l'adsorption de la toxine tétanique par le protagon a été confirmé par diverses expériences résumées dans le tableau II.

TABLEAU II. — Adsorption de diverses protéines par 250 µg de protagon

Préparation de protéine (1 mg)	µg Protéine adsorbée
Toxine tétanique (25 % pure)	80
Toxine tétanique (75 % pure)	130
Anatoxine tétanique (brute)	21
Toxine diphtérique (brute)	5
Toxine dysentérique (brute)	4
Toxine de <u>Clostridium perfringens</u> type A (brute)	4
Toxine de <u>Clostridium perfringens</u> type B (brute)	8
Toxine de <u>Clostridium perfringens</u> type C (brute)	4
Toxine de <u>Clostridium perfringens</u> type D (brute)	6
Trypsine cristallisée	4
Pepsine cristallisée	3
Lysozyme cristallisé	14
Sérumalbumine (purifiée)	3
Sérumglobulines (purifiées)	5

Les suspensions de protagon n'adsorbent de façon significative aucune des protéines essayées : toxines diverses (autres que la toxine tétanique), enzymes, protéines inertes, etc.

Le pouvoir adsorbant du protagon ne se manifeste de façon importante que vis-à-vis de la toxine tétanique et (quoique à un degré beaucoup moindre) vis-à-vis de l'anatoxine tétanique. Nous verrons plus loin l'intérêt de cette dernière observation.

Des recherches complémentaires ont permis de préciser les conditions optima pour l'adsorption. Cette dernière atteint son maximum au bout de dix minutes ; elle n'est pas affectée par les variations de température entre 2° et 37°, ni par les variations de force ionique entre 0,01 et 0,25. Elle est maximum à pH = 7,0.

(1) Cette valeur a été recalculée par nous à partir des chiffres fournis par Pillemeyer (3 400-3 600 Lf/mg N ; teneur en azote 15,7 p. 100) pour la toxine tétanique pure, en admettant que l'unité L+ de toxine est égale à 1,146 unités Lf. Ce coefficient est celui que nous avons trouvé [22] pour la toxine que nous avons employée et qui semble présenter la même teneur en toxoïde que la toxine purifiée de Pillemeyer.

Elle augmente en même temps que la concentration en toxine, selon l'isotherme de vant'Hoff.

Nous avons, sur la base de ces données, établi une courbe d'activité (fig. 6, courbe *a*) qui montre la relation entre la quantité de protéine adsorbée et la quantité de récepteur ajouté, l'expérience étant effectuée dans les conditions optima.

La courbe ainsi tracée permet de définir une unité-récepteur arbitraire comme la quantité de récepteur qui fixe 10 unités L+ de toxine (ou 20 µg) [à partir d'une solution à 30 unités L+/ml].

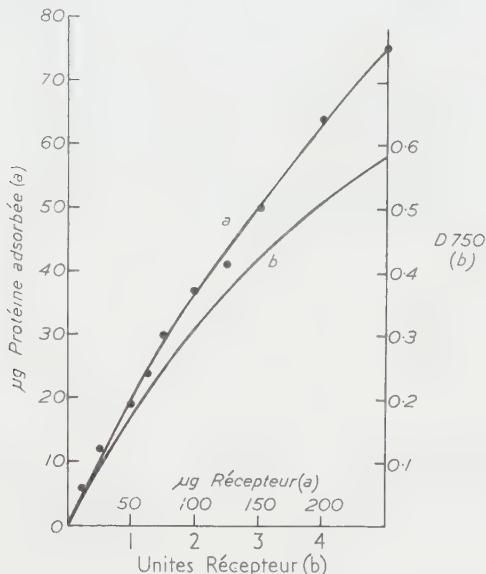


FIG. 6. — Courbes d'activité (*a*) et d'étalonnage (*b*).

Nous avons ensuite tracé une courbe d'étalonnage en portant en abscisse la quantité de récepteur ajouté et en ordonnée, directement, l'absorption à 750 mµ, c'est-à-dire la coloration développée lors de l'estimation de la quantité de protéine adsorbée par la méthode de Lowry [14].

A l'aide de cette courbe, on peut effectuer 20 à 50 essais de récepteur en trois heures. Cette amélioration de la technique de titrage nous a permis de passer au stade suivant de nos recherches, à savoir : l'essai d'identification du récepteur.

Dans nos premières expériences de distribution à contre-courant, l'activité « Récepteur » disparaissait à nouveau, comme dans les expériences initiales. Toutefois, en combinant des prélèvements de toutes les fractions, on recouvrait la pleine activité « Récep-

teur ». Ceci est illustré dans l'expérience suivante : le système de solvants utilisé était celui de Gregory et Craig [8], consistant en 15 parties de chloroforme, 15 parties de benzène, 23 parties d'alcool méthylique et 7 parties d'eau. Ce mélange se sépare en deux phases non miscibles, la phase supérieure étant la plus riche en eau. Entre ces deux phases, il y avait distribution de protagon : on évaporait le solvant de chaque phase, on remettait en suspension dans l'eau le résidu, et on essayait les suspensions pour l'activité « Récepteur ». 70 p. 100 des solides totaux se trouvaient dissous dans la phase inférieure et 30 p. 100 dans la phase supérieure.

TABLEAU III. — Complexité du récepteur.

Système	Unités-Récepteur
5 mg Protagon, avant addition à 1 ml phase inférieure + 1 ml phase supérieure	65
3,5 mg Composant de la phase inférieure	5
1,5 mg Composant de la phase supérieure	0
3,5 mg Composant de la phase inférieure + 1,5 mg composant de la phase supérieure	56

rieure, mais dans la phase inférieure 8 p. 100 seulement de l'activité se recouvrait. La récupération était nulle dans la phase supérieure. Même en mélangeant les suspensions, il était impossible de recouvrir la moindre activité « Récepteur ». Par contre, en mélangeant des volumes égaux des deux phases dans un solvant organique, puis en évaporant ce solvant et en remettant en suspension le résidu dans de l'eau, on obtient la récupération presque totale du récepteur. Ceci se trouve démontré dans le tableau III. Les suspensions aqueuses des substances contenues dans la phase inférieure, quand on les centrifugeait, donnaient un culot granulaire et opaque, mais des suspensions des deux phases combinées donnaient des culots translucides, comme de la gelée. Cette expérience suggérait que le récepteur est composé de deux substances au moins, chacune inactive par elle-même et séparées par les deux phases du système solvant, et que ces deux composants forment un complexe et ne sont pas seulement des co-facteurs.

dont la présence simultanée en suspension serait nécessaire pour l'activité « Récepteur ».

Puisque tous les efforts pour séparer le récepteur de la phrénosine avaient échoué et puisque la phrénosine était soluble dans le solvant de la phase inférieure, on a fait une expérience pour déterminer si le composant de la phase inférieure pouvait être remplacé par la phrénosine. Le tableau IV démontre que ceci est possible et que d'autres cérebrosides sont également actifs. Dans les conditions de l'essai, la sphingomyéline ne remplaçait pas le composant inférieur, mais nous verrons que ce résultat négatif était dû à des circonstances particulières.

TABLEAU IV. — Remplacement du composant de la phase inférieure par phrénosine ou cérebrosides mixtes.

Système	Unités-Récepteur
3,5 mg Composant de la phase inférieure	4
1,5 mg Composant de la phase supérieure	0
2,5 mg Phrénosine	7
2,5 mg Cérebrosides mixtes	6
2,5 mg Sphingomyéline	4
Composant, phase inférieure + phrénosine	4
Composant, phase supérieure + phrénosine	64
Composant, phase supérieure + cérebrosides mixtes	65
Composant, phase supérieure + Sphingomyéline	6

De temps à autre, des complexes de phrénosine et du composant de la phase supérieure n'adsorbaient pas la toxine tétanique, surtout quand on avait purifié le composant de la phase supérieure par extraction répétée avec le solvant de la phase inférieure. Ce composant purifié de la phase supérieure était soluble dans l'eau. Cette absence apparente d'adsorption de la toxine s'observait régulièrement chaque fois qu'on employait des poids égaux de phrénosine et de composant purifié de la phase supérieure. La figure 7 démontre qu'on obtient l'activité maximum de récepteur quand le rapport du composant de la phase supérieure par rapport à la phrénosine est approximativement 1 : 2. Cette absence apparente d'adsorption de la toxine est due au fait que, lorsque le rapport entre le composant de la phase supérieure et

la phrénosine dépasse 1 : 2, le complexe devient de plus en plus soluble dans l'eau et le culot centrifugé du complexe récepteur progressivement plus faible. Cette solubilisation du complexe peut être empêchée en incorporant dans le complexe du calcium, quoique le calcium n'affecte pas seulement la solubilité du composant de la phase supérieure. On obtient des résultats semblables en remplaçant par de la sphingomyéline, la phrénosine, comme on peut le voir sur la figure 8, quoique les complexes avec sphingomyéline, avec et sans calcium, soient plus solubles dans l'eau que ceux avec la phrénosine. Puisque l'essai du récepteur nécessite la centrifugation du complexe récepteur-toxine, il dépend non

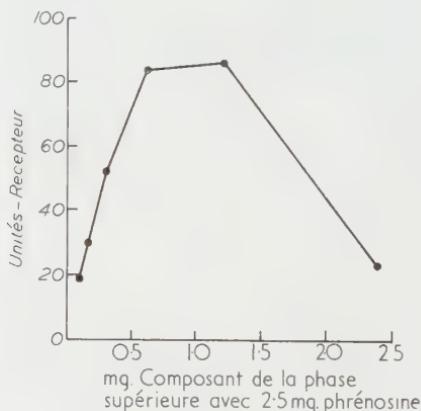


FIG. 7. — Activité récepteur du composant de la phase supérieure + phrénosine.

seulement de la capacité du récepteur de se combiner avec la toxine, mais aussi de son insolubilité dans l'eau et de sa capacité de sédimerter par centrifugation. Le tableau V montre que l'incorporation de calcium augmente la capacité apparente de fixer la toxine des complexes phrénosine et aussi sphingomyéline. En l'absence de calcium, tous les complexes de sphingomyéline et des composants de la phase supérieure sont hautement solubles dans l'eau, d'où l'incapacité apparente, rapportée dans le tableau IV, de la sphingomyéline à remplacer le composant de la phase inférieure.

Puisque la substance grise a une teneur en récepteur plus grande que la substance blanche, et puisque le composant de la phase inférieure s'y trouve en concentration plus grande que dans la substance blanche, il en résulte que le composant de la phase supérieure devrait se trouver à concentration plus grande dans la substance grise. Les seuls lipides dont on connaît l'existence

dans la matière grise (0,6-0,7 g/100 g tissu frais) à une concentration plus grande que dans la matière blanche (0,06-0,07 g/100 g tissu frais) sont les gangliosides, connus aussi sous les noms de

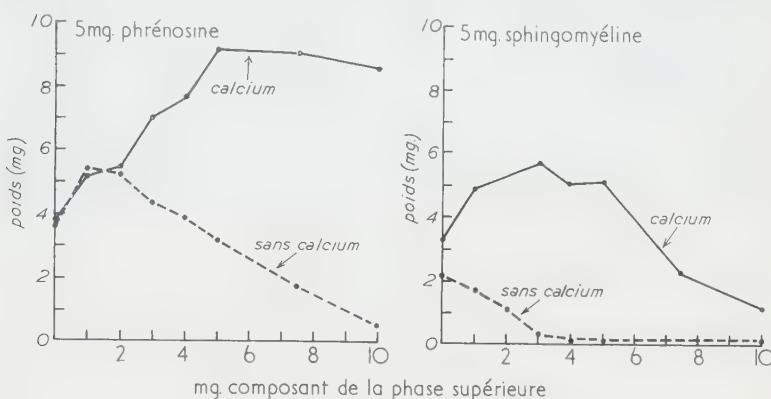


FIG. 8. — Poids des complexes insolubles du composant de la phase supérieure + phrénosine ou sphingomyéline, avec et sans calcium.

TABLEAU V. — Effet du calcium sur la sédimentation de la toxine en complexe avec le récepteur.

2,5 mg Composant de la phase supérieure avec	Unités-Récepteur	
	Sans calcium	Calcium
2,5 mg Phrénosine	39	200
2,5 mg Sphingomyéline	13	133

strandins ou mucolipides (Le Baron et Folch [41]). Les gangliosides sont apparentés aux cérebrosides, mais contiennent des résidus additionnels d'hexose, d'hexosamine et d'acide neuraminiqne liés par des liens co-valents, peut-être de la manière indiquée dans la figure 9. Dans une solution aqueuse, les structures minima reproduites dans la figure 9 se polymérisent ou se rassemblent pour former des particules de poids moléculaire 180 000-250 000 [4, 6, 21]. Les particules macromoléculaires, selon la méthode d'extraction du tissu nerveux utilisée, sont susceptibles de contenir ou de ne pas contenir divers résidus d'amino-acides et un résidu additionnel d'acide neuraminiqne pour deux résidus de sphingosine, mais on ne sait pas avec certitude s'il s'agit de

constituants de la molécule ou de contaminants [4, 20]. Les constituants aliphatiques rendent solubles les gangliosides dans les solvants organiques et les résidus d'acide neuraminique les rendent solubles dans l'eau. Les résidus d'acide neuraminique sont aussi responsables du résultat positif de la réaction de Bial, observé avec les gangliosides. Le composant de la phase supérieure soluble dans l'eau fournit, après traitement par le réactif de Bial, une matière colorante qui présente un maximum d'absorption à $570 \text{ m}\mu$. Tous ces faits suggèrent que les gangliosides devraient pouvoir remplacer le constituant de la phase supé-

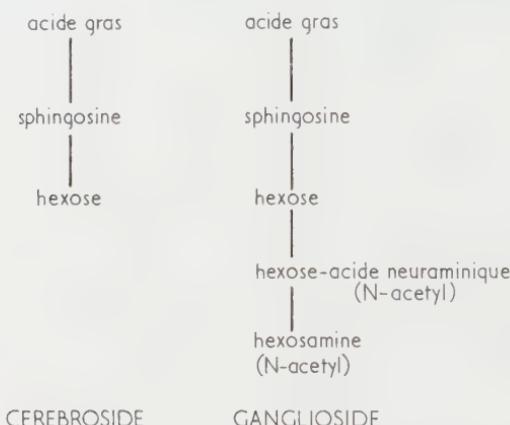


FIG. 9. — Cérébroside et ganglioside.

rieure. La figure 10 démontre qu'il en est bien ainsi. Quand on incorpore du calcium dans des complexes ganglioside-cérébroside qui contiennent des poids égaux des deux composants, le calcium les empêche de devenir solubles dans l'eau et ces complexes fixent un poids égal de toxine tétanique.

Le récepteur de la toxine tétanique dans la matière grise du tissu nerveux paraît donc être un complexe de ganglioside et de cérébroside ou de sphingomyéline. Ce complexe est insoluble dans l'eau, et c'est son existence qui explique qu'il ne soit pas possible d'extraire les gangliosides du tissu nerveux par l'eau, quoi qu'ils soient solubles dans l'eau. Il est nécessaire, pour obtenir les gangliosides, de rompre préalablement le complexe cérébroside-ganglioside par une partition entre solvants non miscibles.

Puisque le ganglioside contient des moitiés de cérébroside dans sa molécule, on doit se demander quelle est la fonction du compo-

sant cérébroside du complexe récepteur, d'autant plus que la sphingomyéline peut remplacer le cérébroside. L'observation du phénomène Wassermann-Takaki et l'essai du récepteur dépendent de la possibilité d'éliminer le complexe récepteur-toxine par la filtration ou la centrifugation, car *le complexe récepteur-toxine, s'il est injecté sous forme d'une suspension, est aussi toxique que la toxine contenue dans le complexe.* La fonction du composant cérébroside pourrait donc ne pas être spécifique vis-à-vis de la toxine. Le cérébroside permettrait seulement de rendre insoluble le complexe toxine-ganglioside, par lui-même soluble. Un tel complexe soluble devrait avoir un poids moléculaire élevé,

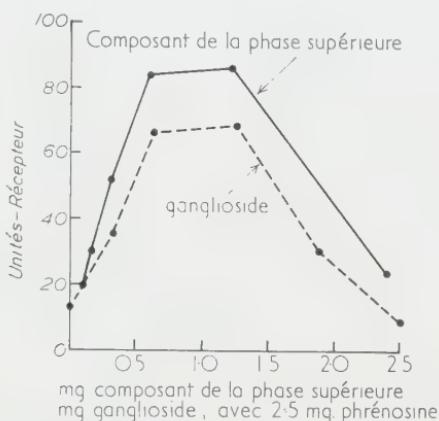


FIG. 10. — Activité récepteur du composant de la phase supérieure ou du ganglioside + phénolosine.

supérieur à 200 000, et devrait sédimenter rapidement par ultracentrifugation.

L'expérience suivante a prouvé qu'il en était bien ainsi. Dans une série de tubes pour ultracentrifugeur Spinco, modèle L, on a placé des solutions contenant du ganglioside (dépourvu de résidus d'amino-acides) mélangées respectivement avec de la toxine tétanique (75 p. 100 pure) et deux autres protéines pour comparaison : du lysozyme cristallisé et de la trypsine cristallisée. Des tubes témoins contenaient de la toxine, du lysozyme et de la trypsine, mais pas de ganglioside. Après mélange, les tubes étaient centrifugés à 114 400 g pendant deux heures. On séparait alors, pour rechercher la protéine et éventuellement le ganglioside, les moitiés supérieure et inférieure du contenu de chaque tube. Les résultats rapportés dans le tableau VI montrent que c'est seulement dans le cas de la toxine que le ganglioside

a modifié la vitesse de sédimentation de la protéine. C'est donc bien le composant ganglioside du complexe récepteur qui fixe la toxine. Des expériences analogues ont démontré que, si l'on élimine du ganglioside l'acide neuraminique par hydrolyse à pH = 3, la substance résiduelle cesse de fixer la toxine, et que l'acide neuraminique seul ne la fixe pas. On ne sait pas encore si le résidu hexosamine est essentiel pour la fixation de la toxine.

TABLEAU VI. — Effet du ganglioside sur l'ultracentrifugation de la toxine.

Système	Ganglioside	Protéine
Toxine seule	-	28,8 %
Toxine + ganglioside	82,4 %	80,2 %
Lysozyme seul		30,4 %
Lysozyme + ganglioside	81,0 %	24,4 %
Trypsine seule		23,2 %
Trypsine + ganglioside	84,0 %	24,2 %

Les chiffres expriment, en pourcentage, la fraction de ganglioside ou de protéine qui migre, après deux heures de centrifugation à 114 000 g, de la moitié supérieure à la moitié inférieure du tube à centrifuger.

La question qui se présentait naturellement ensuite était la suivante : est-ce qu'il survient une modification de la structure du ganglioside après son union avec la toxine ? Divers résultats suggèrent que ce n'est pas le cas. Après avoir mis en contact le ganglioside avec de la toxine à haute concentration à 37°, pendant seize heures, on a noté qu'aucune substance ne se trouvait libérée du ganglioside, qui sédimentait à 114 400 g plus lentement que le ganglioside, ou qui fut capable de diffuser à travers une membrane dialysante, ou de donner une réaction positive de Bial. De plus, si la toxine était adsorbée sur le complexe ganglioside-cérébroside, la suspension étant incubée à 37° pendant seize heures, et qu'ensuite la toxine était retirée du complexe par de l'alcali, la capacité du complexe récepteur pour fixer la toxine restait inchangée.

DISCUSSION.

Depuis la découverte du phénomène de Wassermann-Takaki, il y a soixante ans, on a supposé que la fixation de la toxine téta-nique par le tissu nerveux était en rapport direct avec le mode d'action de la toxine (*Cf.* Fildes [3]). Cette hypothèse se trouve

renforcée par la démonstration actuelle de l'affinité puissante et de la spécificité élevée du récepteur pour la toxine. Elle trouve aussi une confirmation dans le travail de Marcel Raynaud et de ses collègues [12, 13, 19, 20] et dans la découverte, rapportée au tableau II, que l'anatoxine tétanique est aussi fixée par le récepteur, quoique à un degré bien moindre que la toxine. Pons [17] et Fulthorpe [7] ont constaté que le cerveau entier ne fixait pas l'anatoxine, mais ceci ne contredit pas nécessairement les constatations actuelles, puisque l'activité récepteur du protagon brut est quarante fois plus grande que celle du cerveau entier. Le groupe de l'Institut Pasteur a démontré que l'injection antérieure de doses massives d'anatoxine à des souris ou à des cobayes retardait ou empêchait la mort par injection, vingt-quatre heures plus tard, d'une dose de toxine qui serait mortelle, à défaut de l'injection préalable d'anatoxine. Ce phénomène semble apparenté à la constatation de Wolters et Fischoeders [24] et de Fulthorpe [7], que si le tissu du cerveau se trouve d'abord exposé à l'anatoxine tétanique, sa capacité d'adsorber la toxine tétanique est diminuée. Evidemment, l'anatoxine à concentration assez élevée pour compenser son affinité relativement faible pour le récepteur, entre en concurrence avec la toxine pour les sites récepteurs dans le tissu nerveux. Les recherches effectuées à Garches démontrent que, lorsque cela a lieu, et que par conséquent la toxine n'est pas fixée, l'animal ne succombe pas à la toxine.

La fixation de la toxine est une condition préalable pour que se manifeste son action mortelle, mais on ne sait pas encore si le ganglioside responsable de cette fixation est la substance sensible à la toxine. Elle ne paraît pas se trouver changée par la toxine, mais cela n'implique pas nécessairement qu'elle ne joue pas un rôle dans la lésion biochimique d'intoxication. Une possibilité qu'on pourrait, par exemple, envisager (possibilité difficile à essayer, et, par conséquent, peu attirante) c'est que le ganglioside occupe des sites stratégiques au niveau de la synapse inhibitrice et que la toxine, en se combinant avec lui, bloque ces sites et empêche le passage de l'influx inhibiteur.

D'un autre côté, il se peut que le ganglioside ait la fonction plus subsidiaire de transporter la toxine d'un site périphérique d'infection à un site central d'action et de la localiser à ce site. Il semble clair que la toxine tétanique se transporte de manière centripète le long des troncs nerveux jusqu'au cordon médullaire, mais l'idée que la toxine se déplace dans les axones ne provoque pas beaucoup d'enthousiasme. On a fait la suggestion qu'elle est mécaniquement propulsée le long de canaux situés parmi les fibres nerveuses [25]. La toxine injectée dans les muscles disparaît rapidement du tissu musculaire et ne peut être retrouvée ultérieurement que dans les troncs nerveux. Ceci suggère peut-être

un mécanisme plus spécifique que celui impliqué dans l'idée que la toxine est propulsée mécaniquement le long de canaux situés parmi (mais pas dans) les fibres nerveuses, et la suggestion d'un mécanisme spécifique invite à supposer l'existence d'un récepteur spécifique. Il est vrai que le tronc nerveux a très peu de capacité, en comparaison avec le cerveau, pour fixer la toxine [7] et contient très peu de ganglioside [5]; mais selon Svennerholm [21], le ganglioside se trouve presque exclusivement à l'intérieur des cellules nerveuses, de leurs dendrites et de leurs axones. Les axones constituent seulement une partie peu considérable de la masse totale des troncs nerveux, mais ceux-ci peuvent être assez riches en ganglioside pour expliquer l'adsorption de la toxine et, de façon ou d'autre, son transport. De plus, si les gangliosides ne se trouvent qu'à l'intérieur des cellules nerveuses, ils pourraient avoir pour fonction de concentrer la toxine dans les cellules et de la retenir, en l'empêchant de diffuser et de se disperser, ce qui expliquerait sa conduite extraordinairement économique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BROOKS (V. B.), CURTISS (D. R.) et ECCLES (J. C.). *Nature*, 1955, **175**, 120.
- [2] COLEMAN (G. E.). *J. inf. Dis.*, 1924, **34**, 614.
- [3] FILDES (P.). *Medical Research Council : A system of bacteriology*, 1929, **3**, 298. H. M. Stationery Office, London.
- [4] FOLCH (J.), ARSOVE (S.) et MEATH (J. A.). *J. biol. Chem.*, 1951, **191**, 819.
- [5] FOLCH-PI (J.) et LE BARON (F. N.). *Metabolism of the nervous system*. Pergamon Press, London, 1957, p. 67.
- [6] FOLCH (J.), MEATH (J. A.) et BOGOCH (S.). *Fed. Proc.*, 1956, **15**, 826.
- [7] FULTHORPE (A. J.). *J. Hyg.*, 1956, **54**, 315.
- [8] GREGORY (J. D.) et CRAIG (L. C.). *J. biol. Chem.*, 1948, **172**, 839.
- [9] KLENK (E.). *Biochemistry of the developing nervous system*. Academic Press Inc., New York, 1955, p. 397.
- [10] LANDSTEINER (K.) et BOTTERI (A.). *Zbl. Bact. Orig.*, 1906, **42**, 562.
- [11] LE BARON (F. N.) et FOLCH (J.). *Physiol. Rev.*, 1957, **37**, 539.
- [12] LEMÉTAYER (E.), NICOL (L.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.) et CHEYROUX (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 672.
- [13] LEMÉTAYER (E.), RAYNAUD (M.), NICOL (L.) et TURPIN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 1.
- [14] LOWRY (O. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR (A. L.) et RANDALL (R. J.). *J. biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
- [15] PILLEMER (L.) et WASTMAN (W. B.). *J. Immunol.*, 1947, **55**, 277.
- [16] PILLEMER (L.), WITTLER (R. G.), BURRELL (J. I.) et GROSSBERG (D. B.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 205.
- [17] PONS (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 209.
- [18] ROSENBERG (A.) et CHARGAFF (E.). *J. biol. Chem.*, 1958, **232**, 1031.

- [19] RAYNAUD (M.), LEMÉTAYER (E.), TURPIN (A.), NICOL (L.) et ROUYER (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 586.
- [20] RAYNAUD (M.) et WRIGHT (E. A.). *Nature*, 1953, **171**, 797.
- [21] SVENNERHOLM (L.). *Acta Soc. Med. Uppsala*, 1957, **62**, 1.
- [22] HEYNINGEN (W. E. VAN). *J. gen. Microbiol.*, 1959, **20**, 291, 301 et 310.
- [23] WASSERMANN (A.) et TAKAKI (T.). *Berl. klin. Wschr.*, 1898, **35**, 5.
- [24] WOLTERS (K. L.) et FISCHÖEDER (E.). *Z. Hyg.*, 1954, **139**, 541.
- [25] PAYLING-WRIGHT (G.). *Pharmacol. Rev.*, 1955, **7**, 413.

DISCUSSION

L'ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE PAR DIFFUSION DANS LES GELS. ETUDE CHRONOPHOTOGRAPHIQUE. PRÉSENTATION D'UN FILM

par P. MANIGAULT.

(*Institut Pasteur, Paris*)

L'intérêt que présente l'influence du temps sur des manifestations de la réaction antigène-anticorps au cours de la diffusion dans les gels m'a amené à penser qu'il était important d'avoir un dispositif expérimental relativement simple qui permettrait d'enregistrer une collection d'images en fonction du temps, ce qui est très exactement la définition de la chronophotographie. Les réactions qui ont été étudiées sont présentées avec des accélérations telles que la journée s'écoule en quatre à huit secondes sur l'écran. Il est utile alors d'utiliser un dispositif bien connu qui consiste à faire apparaître une petite horloge dans le champ de prise de vues, on a ainsi le moyen d'apprécier l'accélération dont on bénéficie. La caméra est une caméra électrique qui a été employée pour copier les microfilms, elle utilise le film 16 mm. La taille de l'image est suffisante pour qu'on puisse éventuellement tirer des épreuves sur papier. L'emploi des émulsions à contraste élevé facilite la perception des phénomènes. Dans les conditions de l'expérience, la caméra électrique fonctionne avec des impulsions de courant qui lui permettent de faire une vue et de s'arrêter. Il faut donc l'associer à un « timer », à un système électronique qui lui donne des impulsions de courant à des temps déterminés et sur deux circuits, ce qui permet d'actionner l'appareil de prise de vues et de commander l'allumage des lampes qui éclairent le sujet un instant avant la prise de vues.

Les Mémoires de J. Oudin, « L'allotypie », et de A. Bussard, « Les réactions enzymes-antienzymes », paraîtront ultérieurement dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

★★

AVIS

Le XIV^e Symposium annuel de Recherches sur le Cancer, consacré à « Physiologie cellulaire et néoplasies » se tiendra à Houston (Texas), les 25, 26 et 27 février 1960.

Pour tous renseignements s'adresser à :

Editorial Office, The University of Texas, M. D. Anderson Hospital, Texas Medical Center, Houston 25, Texas (U. S. A.).

LIVRES REÇUS

A. Delaunay. — *Journal d'un biologiste*. 1 vol., 391 pages. Plon, édit., Paris, 1959.

L'auteur a noté dans ce livre les réflexions ou les événements les plus divers que ses journées de travail ou de lecture l'amenaient à faire ou à rencontrer. Ses travaux personnels (sur le collagène, certaines agglutinines, etc.) ne sont l'objet que de très brèves allusions, mais il nous entraîne dans les domaines les plus variés. Diverses questions scientifiques d'actualité (properdine, C-reactive protein, élastine, élastases, virus orphelins, etc.) sont traitées avec la plus grande simplicité et mises ainsi à la portée de tous, la plupart du temps accompagnées d'anecdotes qui en pimentent l'intérêt. Ainsi à propos de la réserpine nous apprenons que c'est peut-être à ce « relaxant » (adjectif que nous devons à Ambroise Paré) que Gandhi, mâchant des racines de *Rauwolfia*, demandait sa sérénité, et que, si l'on a fondé l'Ordre de Saint-Antoine, c'était pour lutter contre le feu de Saint-Antoine, ou Mal des Ardents, provoqué par l'ergot de seigle. Sténon n'est pas seulement remarquable par la découverte du canal qui porte son nom, mais plus encore peut-être par sa vie édifiante et par la gloire qui lui échut d'être un des fondateurs de la géologie ; on ne s'attendait pas à trouver à Florence le tombeau de ce Danois. L'histoire du Dr Cabanis, celle de Gramme qui, avant de découvrir sa fameuse machine et de devenir un physicien célèbre, était simple ébéniste, ne sont pas moins curieuses. On ne cesse d'être surpris et charmé par la variété des sujets abordés, que l'auteur nous conduise à propos d'un voyage au Danemark, sur la terrasse d'Elseneur, dans la maison de Tycho-Brahé ou dans celle de Kierkegaard, ou qu'il nous fasse assister à « l'aube tragique de l'anesthésie » ou au premier succès spectaculaire du 1162 F à l'hôpital Pasteur, ou encore qu'il nous explique l'origine absolument inattendue du nom de Neanderthal, ou évoque le salon et la famille

de Cuvier au Muséum. Quant aux nombreux savants, artistes ou écrivains avec lesquels il s'est trouvé en rapport et dont le portrait est dessiné, ils vont de Jean Rostand à André Maurois, en passant par d'Arsonval, René Dubos, etc. Bien d'autres sujets sont abordés dans ce volume, et les réflexions personnelles de l'auteur ne sont pas un des moins intéressants. Une curiosité d'esprit aussi vive et aussi variée, révélant une culture si étendue, est extrêmement attachante et le livre se lit d'un bout à l'autre, d'une seule haleine, ne laissant, lorsqu'on arrive au bout, que le regret de devoir le fermer.

H. T.

Répertoire mondial des écoles de médecine, deuxième édition (revue et augmentée), 1958, *Organisation mondiale de la Santé*, Genève ; 328 p. Prix : Fr. s. 12--, £ 1 ou \$ 4,00. Publié également en anglais. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris.)

Des professeurs de médecine de toutes les parties du monde ont participé à la rédaction du *Répertoire mondial des écoles de médecine*. La présente édition, comme la précédente publiée en 1953, énumère les établissements d'enseignement médical de plus de 80 pays en donnant, pour chacun d'eux, un certain nombre de renseignements utiles. Cependant, la portée de l'ouvrage a été considérablement élargie puisqu'on y a ajouté, pour chaque pays, un aperçu de l'organisation générale de l'enseignement et un exposé des principales caractéristiques de la formation médicale des étudiants. En tête de chaque chapitre sont rassemblées quelques données statistiques importantes : population, nombre d'écoles de médecine et de médecins, divers taux par rapport à la population, etc. Une série d'annexes groupent ces chiffres par continent et pour l'ensemble du monde. L'ouvrage contient aussi une carte indiquant le nombre d'habitants par médecin dans le monde. La division de l'enseignement médical en études prémédicales, études précliniques et cliniques et période d'internat variant considérablement d'un pays à l'autre, le Répertoire comprend, en vue de faciliter les comparaisons, un tableau montrant pour chaque pays la durée attribuée à chacune de ces phases.

Le Répertoire renseignera le lecteur sur le système des études médicales dans chaque pays, le documentera sur les établissements d'enseignement existants et lui permettra de faire lui-même une analyse de la formation médicale dans le monde entier.

L. L.

Bilharziose. Activités internationales : 1948-1958. *Organisation mondiale de la Santé*, 1959, 61 p. Prix : Fr. s. 1--, 1/9, \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris.)

Réimpression d'un mémoire spécial de la chronique de l'O. M. S. exposant les problèmes de lutte contre la bilharziose qui se développe dans les pays où on a créé des canaux d'irrigation pour améliorer le sort des collectivités agricoles.

L. L.

Répertoire mondial des centres de traitement pour maladies vénériennes dans les ports. Organisation mondiale de la Santé, Genève, 1959.
(Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris.)

Comité d'Experts du Paludisme : VII^e Rapport. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, 1959, n° 162 ; 55 p.
Prix : Fr. s. 2--, 3/6 ou \$ 0,60. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris.)

Rapport consacré aux techniques d'enquête et de surveillance à appliquer dans les campagnes d'éradication du paludisme, et insistant particulièrement sur la surveillance épidémiologique.

L. L.

Comité d'Experts des drogues engendrant la toxicomanie ; IX^e Rapport. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, 1959, n° 160, 15 p. Prix : Fr. s. 1--, 1/9 ou \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris.)

Recommandations relatives au contrôle international de la nicomorphine, l'oxymorphone, le lévomoramide et le diménoxadol, et de préparations contenant de la norméthadone et du butyrate de dioxyphétyle.

L. L.

Comité d'Experts du personnel dentaire. Rapport. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, 1959, n° 163, 32 p. Prix : Fr. s., 1--, 1/9, ou \$ 0,30. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris.)

Déclaration des maladies transmissibles. Aperçu de législation sanitaire comparée. Tirage à part du n° 4 du volume 9 du *Recueil international de Législation sanitaire, Organisation mondiale de la Santé, Genève, 53 p.* Prix : Fr. s. 2--, 3/6, \$ 0,70. Publié en français et en anglais. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris.)

Virus growth and variation. 9th Symposium of the Society for general Microbiology. 1 vol., 272 p. Cambridge University Press, 1959.
Prix : 35 shillings.

Ce 9^e Symposium de la Society for general Microbiology comprend les rapports suivants : Revue de quelques problèmes courants (Luria). Croissance du bactériophage (Kellenberger). Multiplication des virus des plantes (Harrison). Quelques observations concernant la reproduction des virus animaux contenant de l'ARN (Schäfer). Etude d'infections mixtes avec virus NDV, poliométilitiques et grippaux (Hirst). Interférence virale (Isaacs). Variations contrôlées par l'hôte chez les virus animaux (Hoskins). Etudes de croissance avec le virus de l'herpès (Stocker). Interactions spéciales entre virus et cellule dans le sarcome de Rous (Rubin). Etude du virus vaccinal en cellules HeLa (Maitland

et Postlethwaite). Apports de la chimie à l'étude de la croissance des virus animaux (Cooper). Microscopie en fluorescence : observations de la croissance des virus avec les amino-acridines (Anderson, Armstrong et Niven). Observations au microscope électronique sur les adénovirus et les virus du groupe de la grippe (Morgan et Rose).

L. L.

Ciba Foundation Symposium on Carcinogenesis. Mechanisms of action.
1 vol. 336 p. J. et A. Churchill, édit., Londres, 1959. Prix :
48 shillings.

Comme toutes les monographies de la Fondation Ciba, celle-ci présente, dans le style bien connu, un état de nos connaissances sur la carcinogenèse. Elle permet à ceux qui ne sont pas spécialisés de saisir les éléments essentiels, les résultats, les hypothèses et les projets d'étude, et présente donc un intérêt différent de la lecture des Actes des Congrès Internationaux.

Les principaux chapitres développés concernent : le rôle des virus dans la carcinogenèse ; le rôle des hormones ; la carcinogenèse chez les rats présentant un diabète par alloxane ; l'aspect pharmacologique, l'aspect immunologique et la perte d'antigènes cellulaires spécifiques, en relation avec la carcinogenèse ; le mécanisme biochimique de l'apparition du cancer de la vessie ; l'action des radiations ionisantes ; la transmission chez la souris de la leucémie par des extraits cellulaires filtrés ; le rôle des métaux et des agents de chélation dans la carcinogenèse.

La conclusion en a été tirée par Burnet, insistant sur l'intérêt d'étudier le cancer du point de vue de la dynamique dans les différentes populations de cellules de l'organisme, sur l'importance des mutations somatiques et sur la diversité des mécanismes de carcinogenèse agissant sur les différents clones cellulaires.

A. E.

D. R. Laurence. — *Quantitative methods in human pharmacology and therapeutics.* 1 vol. 253 p. Pergamon Press, 1959. Prix : 45 shillings.

Cet ouvrage, rapport d'un Symposium sur l'action des médicaments, traite des méthodes quantitatives utilisées en pharmacologie et en thérapeutique humaine. Les divers auteurs, chacun dans sa spécialité, mentionnent les techniques de mesure des effets des divers médicaments. C'est ainsi qu'on trouve des articles sur la mesure des effets des hormones de la thyroïde, des analgésiques, des anesthésiques locaux, des médicaments du tube digestif, des inhibiteurs de la transmission neuro-musculaire, etc. Cet ouvrage sera très utile à tous ceux qui s'occupent de pharmacodynamie.

F. B.

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.

Dépôt légal. — 1959. — 4^e trimestre. — Numéro d'ordre 3213. — Masson et Cie, édit., Paris.
Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette, Paris.